

**ANALYSE DER GRANULOZYTENFUNKTION UND DES CD45R-
EXPRESSIONSMUSTERS SOWIE FREQUENZBESTIMMUNG EINER
DEFINIERTEN CD45-PUNKTMUTATION BEI PATIENTEN MIT
AUTOIMMUNTHYREOIDITIS VOM TYP HASHIMOTO**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Sina Weißenborn
geboren am 09.06.1984 in Schmalkalden**

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. med. Dagmar Barz, Institut für Transfusionsmedizin, Jena**
- 2. Prof. Dr. med. Ulrich-Alfons Müller, Klinik für Innere Medizin III, Jena**
- 3. Prof. Dr. med. Gregor Bein, Institut für Transfusionsmedizin, Gießen**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.01.2009

Abkürzungsverzeichnis

α	Signifikanzniveau
ADCC	engl. antibody-dependend cellular cytotoxicity
AG	Antigen/-e
AIK	Autoimmunerkrankung/-en
AIT	Autoimmunthyreoiditis
AK	Antikörper
APC	engl. antigen-presenting cell/-s
CD	engl. cluster of differentiation
CD45RA-C;O	Bezeichnung für die Epitope (A, B, C, O) der CD45-Isoformen; CD45RA-C werden durch die Exone A-C kodiert
C→G	Basenaustausch in der DNA: Cytosin wurde durch Guanin ersetzt
DNA	engl. desoxyribonucleinacid
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
ESS	engl. exonic splicing silencer
FACS	engl. fluorescence-activated cell sorter
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	engl. forward scatter; Vorwärtsstreulicht
FSU	Friedrich Schiller Universität
G1-3	Gate (=Analysefenster) Nummer 1-3
GFT	Granulozytenfunktionstest
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	engl. human immunodeficiency virus
HLA	engl. human leukocyte antigen
HT	Hashimoto-Thyreoiditis
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin/-e
IL	Interleukin/-e

KIM	Klinik für Innere Medizin
LPAP	engl. lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein
mAK	monoklonale/-r Antikörper
MHC	engl. major histocompatibility complex
MS	Multiple Sklerose
Mspl	Moraxella Spezies I
MW	Molekulargewicht/-e
p	statistische Überschreitungswahrscheinlichkeit von α
PBS	engl. phosphate buffered saline
PCR	engl. polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	engl. ribonucleinacid
SKAP55	engl. src-kinase-associated phosphoprotein of 55kD
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SR	Serin (S), Arginin (R)
SSC	engl. side scatter; Seitwärtsstreulicht
Taq	Thermus aquaticus
Tg	Thyroglobulin
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thyroidperoxidase
TSH	Thyroid stimulierendes Hormon
TZR	T-Zellrezeptor
vs.	versus
ZAP	engl. zeta-associated protein

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	III
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Autoimmunthyreoiditis Typ Hashimoto.....	3
2.1.1 Epidemiologie.....	3
2.1.2 Klinik.....	4
2.1.3 Diagnostik.....	5
2.1.4 Prognose.....	5
2.1.5 Therapie.....	5
2.1.6 Ätiologie und Pathogenese.....	6
2.2 CD45-Molekül.....	8
2.2.1 Aufbau.....	9
2.2.2 Funktion.....	10
2.2.3 Regulation des CD45.....	11
2.2.4 Alternatives Spleißen und genetische Polymorphismen.....	12
2.2.5 Bindung der CD45R-AK.....	15
2.2.6 CD45 und Autoimmunerkrankungen.....	15
3 Fragestellung und Ziele.....	17
4 Material.....	18
4.1 Probanden.....	18
4.1.1 Patientenkollektiv.....	18
4.1.2 Kontrollkollektiv.....	18
4.2 Materialien.....	19
4.2.1 Antikörper.....	20
4.2.2 weitere Chemikalien.....	21
4.2.3 Verbrauchsmaterialien.....	22
4.2.4 Geräte.....	23
4.2.5 Software.....	23

5 Experimentelle Methoden	24
5.1 Herstellung von Lösungen.....	24
5.1.1 Herstellung von PBS	24
5.1.2 Herstellung der Lyselösung	24
5.2 Durchflusszytometrische Analytik.....	24
5.2.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie	24
5.2.2 Einstellungen des Durchflusszytometers.....	26
5.2.3 Anfärbung der CD45-AG von Leukozyten mit CD45-mAK	27
5.2.4 Isotypkontrollen für die verwendeten CD45-AK.....	28
5.2.5 Bestimmung der Phagozytoseaktivität von Granulozyten	28
5.3 DNA-Analytik.....	30
5.3.1 Präparation der DNA aus Vollblut.....	30
5.3.2 Nachweis der C→G Punktmutation an Position 77 des Exon A des CD45-Gens	31
6 Statistische Methoden.....	37
6.1 Statistik – CD45R-Expressionsmuster	37
6.2 Statistik – Granulozytenfunktion	37
6.3 Statistik – Mutationshäufigkeit.....	38
7 Ergebnisse	39
7.1 Altersstruktur und Geschlechtsverhältnis in den Kollektiven	39
7.2 Durchflusszytometrische Darstellung der Leukozytenpopulationen	40
7.3 Ergebnisse der Isotypkontrollen	41
7.4 Grundlagen der CD45RO/RA-Expression auf Lymphozyten und Granulozyten.....	43
7.4.1 Charakterisierung eines varianten CD45RA-Expressionsmusters in der Lymphozytenpopulation	44
7.4.2 Charakterisierung eines varianten CD45RA-Expressionsmusters in der Granulozytenpopulation	45
7.5 Verteilung des klassischen und varianten CD45RA-Expressions- musters in den Kollektiven	48

7.6	Molekulargenetische Resultate	48
7.6.1	Nachweis des PCR-Produktes für Exon A des CD45-Gens	48
7.6.2	Nachweis der gesuchten Punktmutation durch RFLP-Analyse	49
7.6.3	Gegenüberstellung der Allelfrequenzen	53
7.7	Vergleich der klassischen mit den varianten CD45RA-Expressions- mustern	54
7.7.1	CD45RO- und CD45RA-Expression auf Lymphozyten	54
7.7.2	CD45RB- und CD45RC-Expression auf Lymphozyten	56
7.7.3	CD45RO- und CD45RA-Expression auf Granulozyten	56
7.7.4	CD45RB- und CD45RC-Expression auf Granulozyten	58
7.8	Vergleich des Patienten- und Kontrollkollektivs unter Ausschluss der Träger des C77G-Polymorphismus	58
7.8.1	CD45RO- und CD45RA-Expression auf Lymphozyten	59
7.8.2	CD45RB- und CD45RC-Expression auf Lymphozyten	60
7.8.3	CD45RO- und CD45RA-Expression auf Granulozyten	60
7.8.4	CD45RB- und CD45RC-Expression auf Granulozyten	61
7.9	Darstellung der Phagozytoseaktivität der Granulozyten	62
8	Diskussion	67
8.1	Allelfrequenz	67
8.2	Diskussion der Ergebnisse zwischen Personen mit varianten und normalen CD45RA-Expressionsmustern	70
8.2.1	CD45R-Expression auf Lymphozyten	70
8.2.2	CD45R-Expression auf Granulozyten	73
8.3	Diskussion der Ergebnisse zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv unter Ausschluss der Träger des C77G-Polymorphismus	76
8.3.1	CD45R-Expression auf Lymphozyten	76
8.3.2	CD45R-Expression auf Granulozyten	77
8.4	Granulozytenfunktionstest	78
9	Schlussfolgerungen	82
10	Literatur- und Quellenverzeichnis	83
11	Anhang	93

1 Zusammenfassung

Hintergrund: Lymphozyten exprimieren, je nach Aktivierungszustand, verschiedene Isoformen des CD45-Moleküls. Dies ist durch alternatives Spleißen der Exone A-C des CD45-Gens möglich. Inaktive T-Zellen prägen die Isoformen ABC, AB, BC und B aus. Nach der Aktivierung sind nur noch die Isoformen O und B auf der Zelloberfläche präsent. Durch eine C→G Transversion an Position 77 des Exon A exprimieren aktive T-Zellen zusätzlich die Isoform AB. Die Transversion kann mit Autoimmunerkrankungen (AIK) assoziiert sein. Ein Einfluss der Punktmutation auf die Granulozytenfunktion ist bisher nicht beschrieben. Granulozyten beugen durch ihre Phagozytosefähigkeit Infektionen vor, welche in der Ätiologie von AIK eine Rolle spielen. Sie exprimieren im Ruhezustand die Isoform O des CD45-Moleküls. Nach Zellaktivierung werden durch die Verschmelzung intrazellulärer Granula Isoformen mit Exon A kodierenden Sequenzen an die Zelloberfläche transloziert.

Fragestellungen: Besteht eine Assoziation des C77G-Polymorphismus zur Hashimoto-Thyreoiditis (HT)? Wie verändert der C77G-Polymorphismus die CD45R-Expression auf Lympho- und Granulozyten? Treten Unterschiede in der CD45R-Expression bei HT-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen auf? Übt die C→G Transversion Einfluss auf die Phagozytoseaktivität der Granulozyten aus? Ist die Phagozytoseaktivität zwischen den Kollektiven unterschiedlich?

Methoden: Bei 73 HT-Patienten und 73 Kontrollprobanden wurde das CD45R-Expressionsmuster der Leukozyten mit einem CD45RA-, -RB-, -RC- und -RO-AK im Durchflusszytometer analysiert. Sämtliche Probanden der Studie wurden auf die C→G Transversion mit einer PCR-RFLP-Analyse getestet. Die Phagozytoseaktivität wurde von 41 HT-Patienten und 42 Kontrollprobanden mithilfe des kommerziell erhältlichen Testkits „Phagotest“ ermittelt.

Ergebnisse: Ein variantes CD45RA-Expressionsmuster - dem C→G Polymorphismus typisch - wurde in beiden Kollektiven je einmal beobachtet. Die molekulargenetischen Untersuchungen bestätigten die Transversion an Position 77 des Exon A bei beiden Trägern des veränderten CD45RA-Musters. Die G-Allelfrequenz ergab einen Wert von 0,69%. Ein Unterschied zwischen den Kollektiven war somit statistisch nicht vorhanden.

Das CD45RA-Expressionsmuster zeigte bei den Personen mit der Transversion im Vergleich zu den Individuen mit dem klassischen CD45RA-Muster folgende statistisch signifikante Veränderungen: Erhöhte Lymphozytenzahl mit CD45RO⁰/RA⁺- und CD45RC⁺-Markierung, sowie in beiden Leukozytenpopulationen gesteigerte Zahl CD45RO⁺/RA⁺- und erniedrigte Mengen CD45RO⁺/RA⁰-Zellen. In der Gegenüberstellung der HT- mit den Kontrollprobanden unter Ausschluss der gefundenen Träger der Punktmutation ergaben sich signifikante Differenzen bzgl. der gesteigerten CD45RA- und CD45RC-Expression auf Lymphozyten sowie der reduzierten CD45RO⁺- und CD45RO⁺/RA⁰-Lymphozytenzahl im Kontrollkollektiv. Weiterhin war eine gesenkte CD45RB-Expression auf Granulozyten in dieser Gruppe vorhanden. Im Granulozytenfunktionstest (GFT) wurde nach Feststellung der Punktmutation bei einem der untersuchten Kontrollprobanden eine Gegenüberstellung dieser Person mit den restlichen Kontroll- und HT-Personen durchgeführt. Es zeigte sich eine erhöhte Phagozytoseaktivität an den ersten beiden Messpunkten ('10min Eisbad' und '1min im 37°C warmen Wasser') bei dem Individuum mit dem varianten CD45-Expressionsmuster im Vergleich mit den beiden anderen Personengruppen. An den genannten Messpunkten zeigte die Gegenüberstellung der Zellen von HT-Patienten mit denen der gesunden Spender eine signifikante Reduktion der Granulozytenaktivität im Patientenkollektiv. Im weiteren Untersuchungsverlauf näherten sich die Aktivitäten der Granulozyten in den Kollektiven an.

Schlussfolgerungen: Eine Assoziation zwischen dem C77G-Polymorphismus und der HT besteht nicht. Die gefundenen Differenzen in der CD45RO- und CD45RA-Expression lassen sich zum einen durch die C77G-Transversion erklären, zum anderen könnte die ständig ablaufende Immunreaktion bei den HT-Patienten verantwortlich sein. Die festgestellten Quantitätsunterschiede der, durch die Exone A-C kodierten Sequenzen in den Kollektiven könnten bei entsprechender Bestätigung in weiteren Studien ein Diagnosekriterium darstellen. Zudem gibt die veränderte Phagozytoseaktivität zwischen den untersuchten Gruppen einen Hinweis auf einen Einfluss der CD45-Isoformen auf diese Granulozytenfunktion. Bestätigt sich dieser Verdacht in weiteren Untersuchungen wären auch Modulationen der CD45-Isoformen und der damit verbundenen Zellfunktion durch AK denkbar.

2 Einleitung

2.1 Autoimmunthyreoiditis Typ Hashimoto

Die Schilddrüse ist ein Organ mit einem vielfältigen Einfluss auf sämtliche Körperfunktionen und erstreckt sich vom Kohlenhydrat-, Fett-, und Proteinstoffwechsel über die Thermoregulation und das Herz-Kreislaufsystem auf den Magen-Darmtrakt sowie das Muskel- und Nervensystem. Durch diese multiplen Funktionen wird die gesamte körperliche, geistige und seelische Entwicklung und Verfassung des Menschen grundlegend beeinflusst.

Fehlfunktionen können mit einem Überschuss an Schilddrüsenhormonen (Hyperthyreose) oder einem Hormonmangel (Hypothyreose) einhergehen. Die Ursachen können in drei Ebenen liegen. Sie können sich im Hypothalamus (tertiär), in der Hypophyse (sekundär) oder der Schilddrüse direkt (primär) befinden. Primäre Ursachen liegen u.a. bei den, im Folgenden beschriebenen, Erkrankungen, Morbus Basedow und Hashimoto-Thyreoiditis (HT), vor.

Die meisten Hyperthyreosen werden durch die AIK Morbus Basedow verursacht. Dabei führen schilddrüsenstimulierende AK zur erhöhten Hormonausschüttung. In wenigen Fällen ist eine Schilddrüsenautonomie für das unausgewogene Hormonverhältnis verantwortlich.

Auch für Hypothyreosen sind mehrere Ursachen bekannt. Neben iatrogenen Veränderungen z.B. durch Strumektomie oder Radiotherapie können auch AIK zum Hormonmangel führen. Die hier untersuchte AIK - chronisch lymphozytäre Hashimoto-Thyreoiditis – geht mit einer Entzündung der Schilddrüse einher. Sie wurde erstmals 1912 von dem japanischen Pathologen und Chirurgen Haku Hashimoto beschrieben (Sawin 2002) und stellt die häufigste AIT dar (Schott und Scherbaum 2006). Diese Erkrankung soll nun näher erläutert werden.

2.1.1 Epidemiologie

Eine Untersuchung in der nordamerikanischen Bevölkerung ergab, dass 10% der untersuchten Personen erhöhte Schilddrüsen-AK aufweisen, von denen 5% eine Hypothyreose (0,3% eine manifeste Hypothyreose) zeigen (Hollowell et al. 2002). Neuere Studien postulieren eine 10%-ige Häufigkeit von klinischen und subklinischen Hypothyreosen. Diese Zahl kann auch für Westeuropa übernommen werden (Parle et al. 1991, Valeix et al. 2004). Dabei sind Frauen

fünf- bis siebenmal häufiger betroffen als Männer (Dayan und Daniels 1996). Das Durchschnittsalter der Patienten bei Diagnosestellung liegt um die 50 Jahre (Manji et al. 2006).

2.1.2 Klinik

Der Krankheitsbeginn bleibt unbemerkt, da die Patienten im initial noch subklinischen Verlauf kein Missverhältnis in der Hormonausschüttung der Schilddrüse aufweisen und deshalb keine Symptome äußern.

Durch die Destruktion von Thyreozyten kann es zu einer massenhaften Freisetzung von präformierten Hormonen kommen. Eine passagere Hyperthyreose ist die Folge. Dieses auch als Hashitoxikose bezeichnete Stadium ist u.a. durch Tachykardie, Nervosität, Gewichtsabnahme und Wärmeintoleranz gekennzeichnet und wird nicht bei allen Patienten beobachtet. Durch die progressive Zerstörung der hormonbildenden Zellen tritt im weiteren Verlauf eine Hypothyreose ein. Erst wenn ein Großteil des Schilddrüsengewebes (>90%) zerstört ist (Auernhammer 2003), werden die Patienten klinisch durch Müdigkeit, Adynamie, Obstipation, Kälteintoleranz und Gewichtszunahme auffällig.

Es sind zwei morphologische Verlaufsformen bekannt:

1. Die als klassische HT bezeichnete hypertrophe Form, welche mit einer Volumenzunahme der Schilddrüse einhergeht. Die Struma (Struma lymphomatosa) zeigt sich im Palpationsbefund derb-elastisch bis gummiartig. Sie kann sekundär in die atrophe Form übergehen.
2. Die atrophe Form, welche durch eine Verkleinerung des Drüsenparenchyms gekennzeichnet ist.

Die HT geht selten mit Lokalbeschwerden einher. Die Struma Hashimoto wächst langsam, verursacht deshalb nur in wenigen Fällen Engegefühl im Halsbereich, Schluck- und Druckbeschwerden oder Atemnot (Spelsberg et al. 2000).

2.1.3 Diagnostik

Die Diagnostik beinhaltet neben einer ausführlichen Anamnese und klinischen Untersuchung vor allem die Labortestung der Schilddrüsenhormone und Auto-AK. Es finden sich meist hochtitrige TPO-AK und Tg-AK (Meng 2001, Spelsberg et al. 2000). AK, die gegen den TSH-Rezeptor oder den Jod-Transporter gerichtet sind, können festgestellt werden, sind aber für die Diagnostik ohne Bedeutung (Riede et al. 2004).

Zusätzlich zu oben genannten Maßnahmen erhärtet eine inhomogene Echoarmut (Nawroth und Ziegler 2001) des Organs in der Sonografie den Verdacht auf das Vorliegen einer HT.

In unklaren Fällen bilden die Szintigrafie - mit einer verringerten Technetiumaufnahme der Schilddrüse (Nawroth und Ziegler 2001) - und die Biopsie weitere Diagnoseoptionen. Das aus der Probeexzision gewonnene histologische Bild weist ein lymphoplasmazelluläres Infiltrat auf (Horn et al. 1999), weshalb die HT auch den Namen „chronisch lymphozytäre Thyreoiditis“ trägt. Bei der atrophischen Form ist zudem noch eine Fibrosierung des Gewebes zu erkennen (Meng 2001).

2.1.4 Prognose

Die HT ist eine chronische Erkrankung mit einem schleichend-progredienten Verlauf, welcher zu einer irreversiblen Zerstörung der Thyreozyten führt.

Da Assoziation mit weiteren AIK, wie dem Diabetes mellitus Typ I, Autoimmungastritis oder dem Morbus Addison beobachtet wurden, ist die Entwicklung von Komorbidität wahrscheinlich.

Eine maligne Entartung der B-Zellen ist bei der Erkrankung ebenfalls möglich. Sie kommt gehäuft bei der klassischen HT in Form von B-Zell-Lymphomen vor. (Spelsberg et al. 2000)

2.1.5 Therapie

Eine kausale Behandlung ist derzeit noch nicht möglich, sodass sich die durchgeführten therapeutischen Maßnahmen auf die auftretende Symptomatik beschränken.

Während die hyperthyreote Initialphase bei Bedarf mit β -Blockern therapiert wird, ist im hypothyreoten Stadium eine lebenslange Einnahme von L-Thyroxin als Schilddrüsenhormonersatz erforderlich.

2.1.6 Ätiologie und Pathogenese

Die Entstehung der HT ist ein multiätiologischer Vorgang, welcher neben Umwelteinflüssen auch humorale, zelluläre und genetische Komponenten einbezieht.

Exogene Ursachen für die Entwicklung der AIT stellen u.a. Zellschäden durch Toxine, virale oder bakterielle Infektionen (Portiankina et al. 1991), Mangel an Selen (Caturegli et al. 2007) oder aber auch eine exzessive Jodzufuhr (Manji et al. 2006) dar. Das erniedrigte Auftreten der HT in Jodmangelgebieten unterstützt die zuletzt getroffene Aussage. Es wird vermutet, dass Jod zusätzlich zu seinem direkten toxischen Effekt auf Thyreozyten durch die Reaktion mit reaktiven Sauerstoffmetaboliten ein inflammatorisches Potential erhält (Bagchi et al. 1990). Beide Mechanismen führen zur Zellzerstörung, welche ein Übermaß an AG bereitstellt. Durch die gestressten Thyreozyten kommt es zusätzlich zur Freisetzung von Hitzeschockproteinen. Sie besitzen immunmodulatorische Effekte und können damit auch zu einem Fortschreiten der AIT führen (Sztankay et al. 1994). Die Einwirkung von Jod kann deshalb sowohl einen initiierenden als auch einen entzündungssupportiven Effekt haben.

Eine unbestrittene Rolle im Entwicklungsprozess der HT hat die humorale Immunität durch die Bildung von Auto-AK. Vermutlich werden sie durch die intrathyroidal gefundenen polyklonalen B-Zellen produziert. Dabei werden die AK gegen die Thyroidperoxidase (TPO-AK) für die Destruktion der Follikelzellen verantwortlich gemacht (Ng et al. 2004). TSH-Rezeptor stimulierende AK und Ig, welche das Wachstum von Schilddrüsenzellen fördern, werden eine Beteiligung bei der Strumaentstehung der hyperthyreoten Verlaufsform nachgesagt (Riede et al. 2004). Eine inhibierende AK-Wirkung am TSH-Rezeptor scheint mit der Entstehung der atrophen Form der HT assoziiert zu sein (McKenzie und Zakarija 1996). Weitere beobachtete Ig sind der Tg-AK und der AK gegen das Kolloidantigen-2 (Boyages et al. 1989). Die Funktionen

dieser beiden Proteine sind zurzeit noch umstritten, sodass ihr Auftreten bisher als Sekundärphänomen betrachtet wird (Schott und Scherbaum 2006).

Ebenfalls wird die Beteiligung der genannten AK an der AK-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) diskutiert (McKenzie und Zakarija 1996). Hierbei werden Lymphozyten durch die spezifische Bindung von AK zur Degranulation von Perforin und Granzymen angeregt. Perforin destruiert die Membran der Zielzelle und ermöglicht den Verdauungsenzymen (Granzyme) den Eintritt ins Zellinnere. Dort wird vermutlich eine Enzymkaskade aktiviert, welche eine Apoptoseinduktion und damit den Untergang der Zielzelle bewirkt (Janeway et al. 2002, Quaratino et al. 2004). Perforinhaltige Lymphozyten wurden im Schilddrüseninfiltrat der HT gefunden (Wu et al. 1994).

Die AK unterstützen den Immunprozess nicht nur durch ihren autoantigenen Angriff sondern auch durch die Bindung von Komplementfaktoren. Dies erklärt das Vorhandensein vieler Komplementkomplexe um die Schilddrüsenfollikel herum (Weetman et al. 1989). Da Thyreozyten gegenüber der durch Komplement vermittelten Zelllyse relativ resistent sind (Tandon et al. 1994), kann dies nicht zur Destruktion der Schilddrüsenzellen führen. Ein denkbarer Mechanismus besteht in der Anlockung von Entzündungszellen mittels chemotaktischer Signale durch Mediatoren und Komplementfragmente, welche bei der Komplementaktivierung abgegeben werden (Janeway et al. 2002). Die Aktivierung der eingewanderten Leukozyten erfolgt sowohl über deren Haftung an die Fc-Bereiche der Auto-AK (Quaratino et al. 2004) als auch über die Bindung des an die Zelle gebundenen Komplementfaktors (Janeway et al. 2002). Dabei kommt es neben einer Zytokinausschüttung zu einer respiratorischen Entladung (respiratory burst) bzw. zur Mobilisation von Membranphospholipiden (Weetman et al. 1992). Arachidonsäure und somit der Vorläufer der Entzündungsmediatoren der Prostaglandin- und Leukotrien-Gruppe wird dabei freigesetzt (Janeway et al. 2002).

Auf zellulärer Ebene wird eine erhöhte Apoptoseneigung der Thyreozyten durch verstärkte Fas-Expression (Spelsberg et al. 2000) auf diesen Zellen diskutiert. Weitere Ansatzpunkte konzentrieren sich neben der Expression und Funktion des/der CD1, CD40, Protein-Tyrosin-Phosphatase-22 und Toll-Like-Rezeptoren auch auf die T-Suppressorzellen (Caturegli et al. 2007). Diese versagen in der

Inhibition der zytokininduzierten Auto-AK-Bildung, die durch die primäre T-Zellaktivierung induziert wird. Der beschriebene Funktionsdefekt der T-Suppressorzellen ist mit den unten aufgeführten HLA-Spezifitäten assoziiert (Meng 2001).

Eine genetische Komponente wird durch das wiederholte Auftreten der HT bei Patienten mit chromosomalen Veränderungen (z.B. Turner-Syndrom, Trisomie 21) (Rapoport 1991, Sundick 1990, Tomer und Davies 1993), die familiäre Häufung (Brix et al. 1998a, Brix et al. 1998b) und die Assoziation zu den HLA-Klasse-II-Molekülen DR3, DR4 bzw. DR5 erkennbar (Schott und Scherbaum 2006). Diese HLA-Spezifitäten gehören zum MHC-II-Komplex. MHC-II wird physiologischerweise nicht von Thyreozyten exprimiert. Allerdings wurden bei der AIT Korrelationen zwischen der Anwesenheit von MHC-II-Komplexen auf den Schilddrüsenzellen und IFN- γ -haltigen T-Zellen berichtet (Hamilton et al. 1991). Da IFN- γ die MHC-II-Expression induziert (Weetman et al. 1985) und MHC-II erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien auf den Thyreozyten beobachtet wurde (Cohen et al. 1988, Voorby et al. 1989), ist die berichtete pathologische Expression von MHC-II-Komplexen bei HT-Patienten eher als eine Konsequenz als eine Ursache für HT anzusehen. Durch diese unphysiologische MHC-II-Expression erlangen diese Zellen die Funktion von antigenpräsentierenden Zellen (APC) und halten durch die damit verbundene T-Zell-Aktivierung den entzündlichen Vorgang aufrecht.

Als Teilursache für AIT kann auch eine genetisch determinierte Veränderung im Zytokinmuster in Frage kommen, denn diese Botenstoffe nehmen vielfältige Aufgaben im Immunsystem wahr (Badenhoop et al. 1992, Hunt et al. 2001).

2.2 CD45-Molekül

Ein Schlüsselmolekül des Immunsystems stellt das transmembranöse Glykoprotein CD45 dar. Es ist ein Oberflächen-AG welches auf allen kernhaltigen hämatopoetischen Zellen und ihren Vorläuferzellen vorkommt und bedeckt bis zu 10% der Zelloberfläche (Thomas 1989).

Das zugehörige Gen liegt auf Chromosom 1 (Region 1q31-32). Es besteht aus 33 Exonen (Hall et al. 1988).

2.2.1 Aufbau

Seine Struktur gliedert sich in 3 Komponenten:

1. zytoplasmatische Domäne

Diese Region zeichnet sich durch eine hohe Konstanz zwischen Säugetieren aus. 95% dieses Areal sind zwischen allen Säugern gleich, während nur 35% Übereinstimmung in der extrazellulären Domäne gefunden wurden (Thomas 1989).

Zwei Phosphataseregionen, D1 und D2, bilden das zytoplasmatische Ende des CD45-Moleküls. Während D1 durch seine Phosphataseaktivität andere Moleküle manipuliert, ist die Aufgabe des D2 noch nicht klar definiert. Für D2 werden modulierende und regulierende Einflüsse auf Zellprozesse diskutiert. Sie könnten durch die als „keilartig“ beschriebene Funktion von D2 (Bilwes et al. 1996) und damit durch intramolekulare Interaktionen mit anderen zytoplasmatischen Regionen z.B. D1 zu Stande kommen (Desai et al. 1994, Felberg und Johnson 1998, Felberg und Johnson 2000, Hayami-Noumi et al. 2000).

2. Transmembrandomäne

Die aus hydrophoben Aminosäuren gebildete Region dient der Verankerung des Moleküls in der Zellmembran (Rebstock 2006).

3. extrazelluläre Domäne

An die Transmembranregion schließt sich eine Homologie von Fibronectin-III an. Nach dieser Sequenz folgt eine cysteinreiche Region. Sie geht in einen variablen Abschnitt über. Dieser wird durch die verschiedene Kombination der Exone A, B und C kodierenden Sequenzen gebildet. Durch alternatives Spleißen können aus den Produkten dieser Exone theoretisch 8 verschiedene Isoformen des CD45-Moleküls, nämlich ABC, AB, AC, BC, A, B, C, O (Abb.1) gebildet werden. Auf humanen Zellen werden nur 5 dieser 8 Isoformen gefunden. Dabei werden die Isoformen A, C und AC nicht auf humanen Zellen exprimiert.

Die Anheftung von Zuckerstrukturen an die Bestandteile der Extrazellularregion rechtfertigt den Begriff des Glykoproteins.

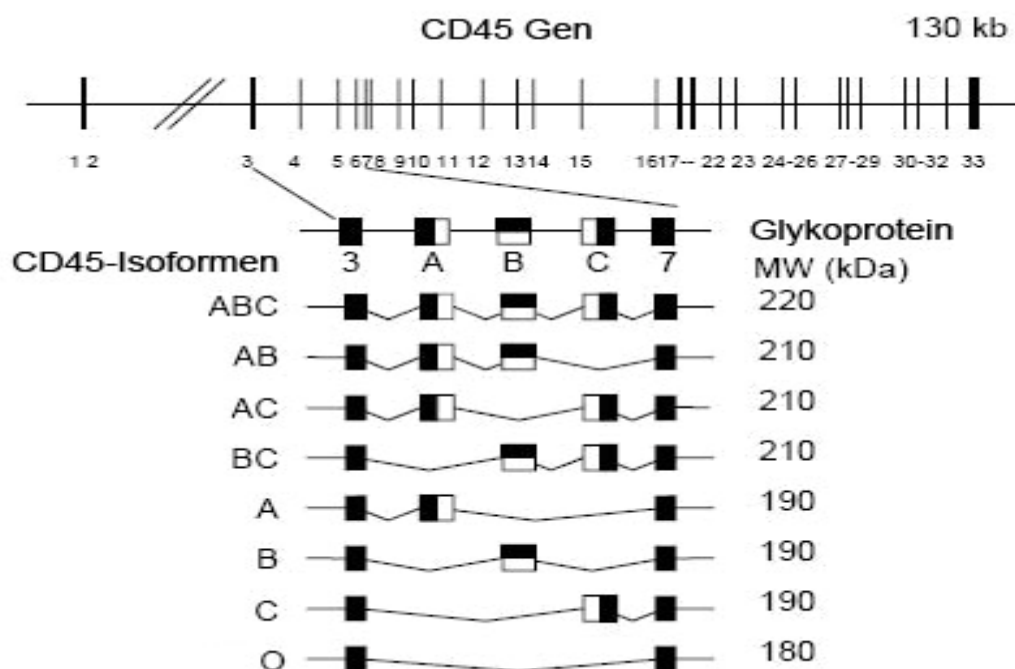


Abb. 1: Darstellung des CD45-Gens mit seinen Exonen (Zahlen von 1-33)

Die für die acht verschiedenen Isoformen essentiellen drei Exone (A; B; C) des CD45-Gens sind gesondert hervorgehoben. Die Molekulargewichte (MW) der Isoformen sind rechts angegeben. (Tchilian und Beverley 2006, modifiziert)

2.2.2 Funktion

Die Funktionen des CD45-AG sind vielfältig. Sie erstrecken sich durch die Modulation von Signalwegen von der Regulation von Rezeptorsignalen (u.a. auf AG, Wachstumsfaktoren und Zytokine), der B- und T-Zellaktivierung mit Aktivierung der Gentranskription, der Stimulation von B-Zellen zur AK-Produktion bis hin zur Beeinflussung der Zellproliferation. Daher sind sie Bestandteil der Regulation der Immunantwort, welche durch B- und T-Zellen aufrechterhalten wird.

Die Aufgaben des CD45-Moleküls in der myeloischen Zellreihe liegen im Gegensatz zu den Lymphozyten größtenteils noch im Dunkeln. Vermutet wird eine Beteiligung in der Zelldegranulation (Berger et al. 1994) sowie die Modulation chemokininduzierter Signale in Neutrophilen (Mitchell et al. 1999). Weiterhin wird ein Einfluss auf die Chemotaxis (Harvath et al. 1991, Gatewood et al. 1991, Kuijpers et al. 1992), die oxidative Entladung (Liles et al. 1995) und die Phagozytose (Yu et al. 2002) diskutiert.

2.2.3 Regulation des CD45

Für die Regulation der CD45-Phosphataseaktivität werden mehrere Faktoren verantwortlich gemacht. Die Bindung von Liganden, die Interaktion mit anderen Proteinen sowie die Beeinflussung durch spezifische intrazelluläre Inhibitoren, wie NADPH (Fialkow et al. 1997), sind vermutete Einflussfaktoren (Hermiston et al. 2003).

Als mögliche Liganden werden CD22 und Galectin-1 diskutiert (Stamenkovic et al. 1991, Walzel et al. 1999), wobei ihre Bindung unspezifisch an T-Zell-Glykoproteine erfolgt (Pace et al. 1999, Pace et al. 2000, Trowbridge und Thomas 1994). Beweise für die Modulation der Phosphataseaktivität des CD45-Moleküls durch diese Faktoren gibt es bisher jedoch nicht. Weitere, evtl. zufällige Interaktionen des CD45-Moleküls im extrazellulären Bereich mit Thy-1, dem TZR und CD2 (Trowbridge und Thomas 1994) wurden beobachtet.

In anderen Studien wurde die Wechselwirkung von CD100 mit CD45-Isoformen, welche ein oder zwei variable Produkte der Exone A-C enthalten, beobachtet. Diese Verbindung soll Einfluss auf die T-Zelladhäsion haben (Herold et al. 1996). Des Weiteren wird für die Transduktion wachstumsinhibierender Signale in T-Zellen eine Konnektion zu der α -Kette des IFN-Rezeptors verantwortlich gemacht (Petricoin et al. 1997).

Im Bereich der transmembranen Domäne kommt das Membranprotein LPAP als Interaktionspartner in Frage (Cahir McFarland und Thomas 1995, Kitamura et al. 1995). Es scheint bevorzugt mit CD45-Monomeren zu kommunizieren (Xu und Weiss 2002). Da es widersprüchliche Ergebnisse bzgl. der Beeinflussung des CD45-Moleküls gibt, bleibt es abzuwarten, ob LPAP eine CD45-regulierende Komponente besitzt.

Im intrazellulären Bereich wurde Fodrin und das Adapterprotein SKAP55 als Liganden des untersuchten Glykoproteins identifiziert (Wu et al. 2002). Fodrin stimuliert in Verbindung mit CD45 dessen Phosphataseaktivität in vitro (Lokeshwar und Bourguignon 1992). SKAP55 hingegen übt durch die Bindung an die zytoplasmatische D1-Komponente des CD45 einen positiven Einfluss auf die TZR-vermittelte Gentranskription aus (Wu et al. 2002).

Neben den genannten Möglichkeiten der „Fremdregulation“ durch andere Moleküle, kann sich das CD45-Molekül durch Dimerisation selber in der Aktivität beeinflussen. Es wurde das Phänomen der spontanen

Homodimerisierung beschrieben. Da diese durch chemische Reaktionen in der extrazellulären Domäne moduliert wird, ist sie von den exprimierten Isoformen abhängig. Sie wird häufiger bei der niedermolekularen Isoform O als bei höhermolekularen Formen, wie dem CD45RA beobachtet. Die Dimerisation bedingt die gegenseitige Blockade der katalytischen Zentren der CD45-Moleküle. Damit fällt der aktivierende Einfluss auf den TZR weg und die Immunantwort wird inhibiert. Durch diesen negativen Feedback können unerwünschte Gewebeschädigungen unterbunden werden (Xu und Weiss 2002).

2.2.4 Alternatives Spleißen und genetische Polymorphismen

Der Vorgang des alternativen Spleißens und damit die Zusammenstellung und Expression der CD45-Isoformen hängt mit dem Aktivitäts- und Reifezustand der Zellen zusammen. Naive Lymphozyten, welche noch keinen AG-Kontakt hatten, tragen neben den Isoformen BC und B vor allem die hochmolekularen Formen ABC und AB. O wird auf naiven Zellen nicht exprimiert, sodass diese Zellen CD45RO⁰/RA⁺ sind. Nach Kontakt mit einem AG kommt es zur Aktivierung der Zelle, welche eine Änderung im CD45-Expressionsmuster zu Gunsten der niedermolekularen Formen nach sich zieht. Diese Veränderung ergibt sich durch die Modifikation des Spleißvorganges. Aktivierte Zellen präsentieren nur die Isoformen O und B, sind deshalb negativ für CD45RA und können dementsprechend als CD45RO⁺/RA⁰ deklariert werden (Clement 1992).

Aktivierte und naive Lymphozyten nehmen verschiedene Aufgaben in der Immunabwehr wahr. Welchen Funktionen dabei die einzelnen CD45-Isoformen nachgehen, bleibt Gegenstand intensiver Forschungen.

Die molekularen Einzelheiten, welche den Spleißvorgang regulieren, sind bisher noch nicht komplett aufgeklärt. Man geht von einer multifaktoriellen Steuerung dieses Prozesses aus. In diesem Vorgang interagieren SR-Proteine als Spleißfaktoren mit definierten Regionen in Exon A (Positionen: 8-10bp, 40-91bp, 127-137bp) und Exon C (Position: 16-137bp) (ten Dam et al. 2000). Mutative Veränderungen, die z.B. in Form von Deletionen oder Transversionen in den gefundenen Bereichen auftreten, können dabei Einfluss auf das Spleißverhalten nehmen (Rothrock et al. 2003, Tsai et al. 1989). Dies trifft auf den C77G-Polymorphismus zu. Hierbei ist die Base Cytosin (C) an Position 77

des Exon A gegen Guanin (G) ausgetauscht (synonym: C→G Polymorphismus; C77G-Transversion). Diese Punktmutation verändert zwar nicht die Aminosäuresequenz, zerstört aber das am stärksten wirksame Spleißelement ESS1. Die Funktion des ESS1 besteht in der Inhibition der Transkription des Exon A (Lynch und Weiss 2001). Aus diesem Grund resultiert der Defekt im ESS1 in einer ständigen Transkription und Translation des Exon A und somit in einem varianten CD45RA-Expressionsmuster. Dieses äußert sich in der Präsenz der Isoform AB auf aktiven T-Zellen, welche normalerweise nur die Isoform O und B präsentieren (siehe Abb.2).

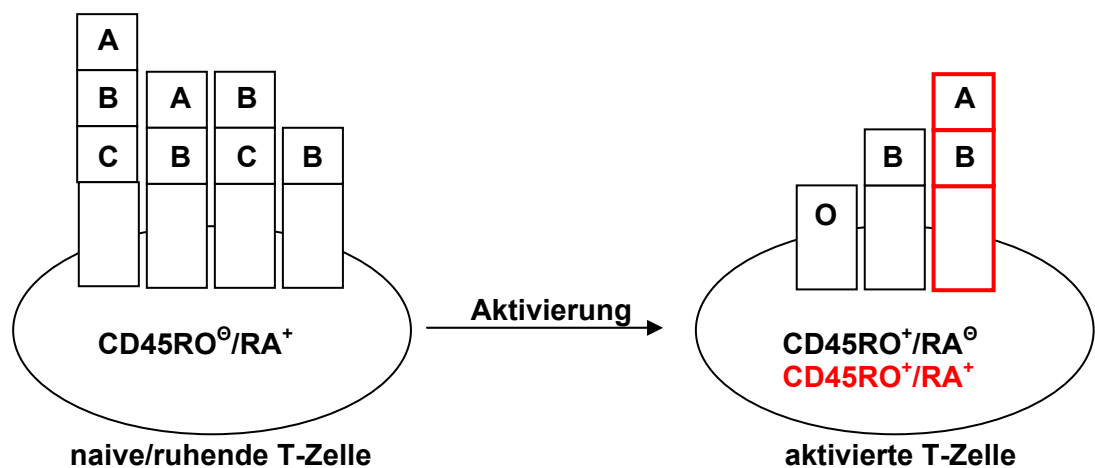


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der CD45-Isoformen auf naiven und aktivierten T-Zellen

Bei Vorhandensein der C77G-Punktmutation kommt es nach der Zellaktivierung zum permanenten Ablesen des Exon A, sodass CD45RA zusätzlich zum normalen Expressionsmuster (schwarz) in der Isoform AB (rot) zu finden ist.

Die beschriebene Transversion der Basen war bei den bisher gefundenen Trägern nur in heterozygoter Form ausgeprägt. Ein homozygoter Merkmals-träger wurde bislang nicht identifiziert (Tchilian und Beverley 2006).

Die Frequenz dieser Mutation unter gesunden europäischen Kontrollprobanden ist gering und in der Literatur mit 0-6,7% angegeben (Ballerini et al. 2002, Barcellos et al. 2001, Boxall et al. 2004a, Cocco et al. 2004, Esteghamat et al.

2005, Gil et al. 2005, Gomez-Lira et al. 2003, Jacobsen et al. 2000, Milterski et al. 2002, Nicholas et al. 2003, Sabouri et al. 2003, Schwinzer et al. 2003, Stanton et al. 2003, Tchilian et al. 2001b, Tchilian et al. 2002, Thude et al. 2004, Vogel et al. 2003, Vorechovsky et al. 2001, Wood et al. 2002). In Deutschland schwanken die Angaben zwischen 0-1,4% (Jacobsen et al. 2000, Milterski et al. 2002, Schwinzer et al. 2003, Thude et al. 2004, Vogel et al. 2003, Wood et al. 2002). Das Auftreten dieser Veränderung scheint mit der ethnischen Herkunft verbunden zu sein. Während in afrikanischen Populationen diese Mutation bisher nicht gefunden werden konnte, kommt sie bei Kollektiven aus Zentralasien mit 6,7% gehäuft vor (Tchilian et al. 2002). Der C77G-Polymorphismus tritt dabei immer unabhängig vom Geschlecht, von der Blutgruppe sowie den HLA-Eigenschaften auf und folgt dem autosomal-dominanten Erbgang mit voller Penetranz (Schwinzer und Wonigeit 1990, Scott et al. 1991). Die beiden Allele des CD45-Gens sind kodominant, sodass immer beide transkribiert und translatiert werden (Schwinzer und Wonigeit 1990).

An der gleichen Position im Exon A wurde eine weitere Transversion beobachtet, bei der Thymin das Cytosin an Position 77 ersetzt. Die Aminosäuresequenz erfährt auch in diesem Fall keine Veränderung. Dieser C77T-Polymorphismus wurde bisher auf eine Assoziation mit MS geprüft, welche sich aber nicht bestätigte (Gomez-Lira et al. 2003).

Neben den Polymorphismen im Exon A sind auch Veränderungen in Exon B und C bekannt (Tchilian und Beverley 2006). Im Exon B ist bislang eine Modifikation beschrieben worden, welche das Guanin an Stelle 69 durch ein Cytosin ersetzte. Dies beeinflusst die Aminosäuresequenz so, dass statt Asparaginsäure Histidin in die Proteinkette für die extrazelluläre Domäne des CD45 eingebaut wird. Eine Arbeitsgruppe fand die G69C-Punktmutation mit einer Frequenz von 1% in der norditalienischen Bevölkerung. Ein signifikanter Unterschied des Kontrollkollektivs zur ebenso untersuchten MS-Gruppe bestätigte sich nicht. (Gomez-Lira et al. 2003). Dieses Resultat schließt eine funktionelle Komponente dieser Punktveränderung in der Pathogenese der MS aber nicht aus.

Eine weitere Basentransversion wurde im Exon C an Position 138 (Adenin wird gegen Guanin ausgetauscht) beschrieben. Folge dieser Punktmutation ist eine

geringere CD45RC-Expression (Stanton et al. 2003). Da bei Patienten mit Morbus Basedow, HT bzw. Hepatitis B eine geringere Häufigkeit dieser Veränderung festgestellt wurde, hat diese vermutlich einen protektiven Charakter auf Erkrankungen (Boxall et al. 2004b).

Ein zweiter Basenaustausch wurde an Position 127 des Exon C beobachtet. Adenin ersetzt an dieser Stelle Thymin und ändert somit die Sequenz der Aminosäuren. Eine Assoziation zur MS konnte bisher nicht nachgewiesen werden, wobei die Studienlage diesbezüglich sehr spärlich ausgeprägt ist (Gomez-Lira et al. 2003).

2.2.5 Bindung der CD45R-AK

Die von den Exonen A-C kodierten und an der Zelloberfläche exprimierten Peptide können durch monoklonale AK (mAK) detektiert werden. Dabei erkennt ein CD45RA-AK alle Isoformen mit Exon A kodierenden Sequenzen (ABC; AB). Ein CD45RB-AK markiert die Isoformen ABC, AB, BC und B, während ein CD45RC-AK die Isoformen ABC und BC kennzeichnet. Werden alle 3 Exone aus der mRNA herausgespleißt, entsteht die Isoform O, welche mit einem CD45RO-AK reagiert.

2.2.6 CD45 und Autoimmunerkrankungen

Die Korrelation zwischen einzelnen CD45-Isoformen und dem Aktivitätszustand von T-Zellen lässt einen Zusammenhang zwischen einer veränderten Isoformexpression und dem Auftreten von AIK vermuten. Die Persistenz höhermolekularer CD45-Isoformen kann beispielsweise durch fehlende Homodimerisierung in einer erhöhten CD45-Aktivität resultieren und damit Grund für eine verstärkte T-Zellaktivität sein. Die dadurch gesenkte Schwelle gegenüber Selbst-AG kann zum Toleranzverlust führen und somit die Entwicklung von AIK unterstützen (Janeway et al. 2002, Schwinzer et al. 2003, Tackenberg et al. 2003, Tchilian et al. 2001b, Vogel et al. 2003).

Des Weiteren kann ein gestörtes Phosphorylierungsmuster von Bedeutung sein (Hermiston et al. 2003). CD45 ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase und beeinflusst durch Phosphorylierungsprozesse die Aktivität anderer Moleküle und damit die Funktion der entsprechenden Zelle. Bestätigt wird dieser Sachverhalt durch bekannte Ergebnisse: (Alloreaktive) CD4⁺-T-Zellen (T-

Helferzellen) wiesen bei Trägern des varianten CD45-Expressionsmusters eine erhöhte Aktivierung von Protein-Tyrosin-Kinasen auf. Als Folge war eine vermehrte Produktion des Wachstumsfaktors IL-2 und eine gesteigerte Proliferationsrate dieser Zellen zu erkennen (Do et al. 2005). Eine herabgesetzte Aktivierungsschwelle ist deshalb auch diesem Zusammenhang denkbar.

Eine Betrachtung des C77G-Polymorphismus in Verbindung mit AIK wurde mehrmals durchgeführt. Ein positiver Zusammenhang zwischen der C→G Transversion und AIK wurde in einigen Studien u.a. bei der Autoimmunhepatitis (Vogel et al. 2003), der Sklerodermie (Schwinzer et al. 2003) sowie der MS (Ballerini et al. 2002, Gomez-Lira et al. 2003, Jacobsen et al. 2000, Vyshkina et al. 2004) gefunden. Andere Arbeiten konnten die Assoziation bei MS und Autoimmunhepatitis nicht bestätigen (Barcellos et al. 2001, Esteghamat et al. 2005, Milterski et al. 2002, Vorechovsky et al. 2001). Studien zum Diabetes mellitus Typ I (Thude et al. 2004, Wood et al. 2002), der dilatativen Kardiomyopathie (Thude et al. 2005) und dem Morbus Basedow (Wood et al. 2002) konnten ebenfalls keinen Zusammenhang nachweisen.

3 Fragestellung und Ziele

Es gibt bereits viele Studien, welche einen Zusammenhang zwischen dem C77G-Polymorphismus im Exon A des CD45-Gens mit dem Auftreten von AIK prüften. Eine Untersuchung dieser Assoziation zur HT wurde dabei noch nicht durchgeführt. Ziel dieser Studie ist, das Wissen bzgl. der mit dem C77G-Polymorphismus assoziierten Erkrankungen zu ergänzen.

Gleichzeitig soll eine Gegenüberstellung der Expression der, durch die Exone A-C kodierten Sequenzen auf Lympho- und Granulozyten zwischen HT-Patienten und dem Kontrollkollektiv bzw. zwischen Trägern des normalen und varianten CD45-Expressionsmusters erfolgen. Bei gefundenen Korrelationen zwischen dem präsentierten CD45-Sequenzmuster und der HT bzw. der Punktmutation ist eine Beteiligung des CD45 in der Ätiologie der HT bzw. von, mit C77G-assoziierten Erkrankungen denkbar. Diagnostische und ggf. therapeutische Interventionen könnten dann entwickelt werden

Während es viele Studien gibt, die das Oberflächen-AG mit der Aktivität und Funktion von Lymphozyten in Verbindung bringen, sind die Granulozyten diesbezüglich in den Hintergrund getreten. Die wenigen durchgeführten Experimente zeigten eine reversible Expressionsänderung des CD45R-Musters auf der Oberfläche der Granulozyten bei Infektion des Organismus. Eine Beeinflussung der Phagozytoseaktivität durch die Zugabe von CD45(R)-AK wurde bereits beobachtet. Diesbezüglich soll nun geklärt werden, ob Korrelationen der Phagozytoseaktivität zu quantitativen Veränderungen im CD45R-Expressionsmuster bestehen und ob die Granulozytenaktivität zwischen den verschiedenen Untersuchungsgruppen verändert ist. Dahingehende Unterschiede könnten die Rolle der Granulozyten im Entstehungsprozess der HT klarer definieren und möglicherweise therapeutische Ansatzpunkte liefern.

4 Material

4.1 Probanden

In dieser Studie wurden sowohl ein Patienten- als auch ein Kontrollkollektiv untersucht. Beide Gruppen wurden gemäß Ethikvotum (Nr. 1491-02/05) durch das ärztliche Personal aufgeklärt und bestätigten ihre freiwillige Teilnahme an dieser Studie mit ihrer Unterschrift auf dem Aufklärungsbogen (Ethikvotum und Aufklärungsbogen im Anhang).

Alle erhobenen Probandendaten wurden anonymisiert.

4.1.1 Patientenkollektiv

Die einbezogenen Patienten, im Durchschnittsalter von 47 Jahren (zu Charakteristika des Kollektivs siehe Punkt 7.1) litten zum Untersuchungszeitpunkt an einer AIK der Schilddrüse, der so genannten chronisch lymphozytären Thyreoiditis bzw. HT. Diese Diagnose wurde durch die Ärzte der endokrinologischen Ambulanz (KIM III) des Universitätsklinikums in Jena gesichert.

4.1.1.1 Patientenkollektiv zur Untersuchung des CD45R-Expressionsmusters

Für die Untersuchung des Expressionsmusters des CD45 (RO, RA, RB, RC), sowie zur Bestimmung der Frequenz der C→G Transversion an Position 77 des Exon A wurden 73 Patienten untersucht.

4.1.1.2 Patientenkollektiv zur Untersuchung der Granulozytenfunktion

Die Phagozytoseaktivität der Granulozyten wurde zusätzlich bei 41 Personen der in Punkt 4.1.1.1 genannten Probanden geprüft.

4.1.2 Kontrollkollektiv

Alle Probanden des Kontrollkollektivs waren gesunde Blutspender des Instituts für Transfusionsmedizin der FSU Jena im durchschnittlichen Alter von 34,5 Jahren (zu Charakteristika des Kollektivs siehe Punkt 7.1). Akute und chronische Erkrankungen der Schilddrüse oder anderer Organe traten bei diesen Probanden nicht auf.

Während einer Routineblutentnahme wurde das benötigte Untersuchungsmaterial, venöses Vollblut (siehe Punkt 4.2), entnommen.

4.1.2.1 Kontrollkollektiv zur Untersuchung des CD45R-Expressionsmusters

73 gesunde Testpersonen wurden auf ihr CD45-Expressionsmuster (RO, RA, RB, RC) getestet.

4.1.2.2 Kontrollkollektiv zur Untersuchung der Granulozytenfunktion

Die Phagozytoseaktivität der Granulozyten wurde zusätzlich bei 42 Personen der in Punkt 4.1.2.1 genannten Probanden geprüft.

Eine Übersicht über die Probandenzahl in den vorgenommenen Untersuchungen stellt Tab.1 dar.

Tab. 1: Anzahl der genutzten Probandendaten

	CD45RO*		CD45RA*		CD45RB*		CD45RC*		PM*		GFT*	
	HT*	K*	HT	K	HT	K	HT	K	HT	K	HT	K
<i>Probandenzahl</i>	73	73	73	73	73	73	73	73	73	73	41	42

- * CD45RO
 - * CD45RA
 - * CD45RB
 - * CD45RC
- } Untersuchung der Expression von Exon A-C kodierenden Sequenzen
- * PM – Bestimmung der Häufigkeit der Exon A Punktmutation
 - * GFT – Untersuchung der Granulozytenfunktion
 - * HT – Zahl der Probanden mit Hashimoto-Thyreoiditis
 - * K – Zahl der Kontrollpersonen

4.2 Materialien

Es wurden pro Proband zwei Monovetten Blut benötigt. Eine Citrat-Monovette (5ml), welche bis zur Untersuchung des CD45R-Expressionsmusters im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt wurde, sowie eine Heparin-Li-Monovette (9ml) zur Untersuchung der Granulozytenfunktion. Letztere wurde bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 24h verarbeitet.

4.2.1 Antikörper

PE-konjugierter CD45RO-AK

- spezifisch für das humane CD45RO-AG
- mAK aus der Maus
- UCHL1
- IgG_{2a}
- Caltag Laboratories, Burlingame, USA

FITC-konjugierter CD45RA-AK

- spezifisch für humane CD45-Isoformen, die die Exon A kodierende Sequenz enthalten
- mAK aus der Maus
- MEM-56
- IgG_{2b}
- Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA

FITC-konjugierter CD45RB-AK

- spezifisch für humane CD45-Isoformen, die die Exon B kodierende Sequenz enthalten
- mAK aus der Maus
- PD7/26
- IgG_{1;κ}
- DakoCytomation, Glostrup, DK

FITC-konjugierter CD45RC-AK

- spezifisch für humane CD45-Isoformen, die die Exon C kodierende Sequenz enthalten
- mAK aus der Maus
- MT2
- IgG₁
- IQProducts, Groningen, NL

PE-konjugierte AK zur Isotypkontrolle des CD45RO-AK

- spezifisch für Trinitrophenal, welches nicht auf humanen Zellen bzw. Zelllinien vorkommt
- mAK aus der Maus
- G155-178
- IgG_{2a}
- BD Biosciences, San Jose, USA

FITC-konjugierter AK zur Isotypkontrolle des CD45RA-AK

- spezifisch für Dansyl [5-(Diemthylaminol)naphthalene-1-sulfonyl], welches nicht auf menschlichen Zellen bzw. Zelllinien exprimiert wird
- mAK aus der Maus
- 27-35
- IgG_{2b}
- PharMingen, San Diego, USA

FITC-konjugierter AK zur Isotypkontrolle des CD45RB- & CD45RC-AK

- spezifisch für KLH (Keyhole limpet hemocyanin), welches nicht auf humanen Zellen bzw. Zelllinien exprimiert wird
- mAK aus der Maus
- X40
- IgG_{1; κ}
- Becton Dickinson, San Jose, USA

4.2.2 weitere Chemikalien

- | | |
|---|--------------------------------------|
| - 80%-iger Alkohol | Zentralapotheke der Uniklinik Jena |
| - 96%-iger Alkohol | Zentralapotheke der Uniklinik Jena |
| - Agarose | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| - AmpliTaq DNA Polymerase | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| - CD45RA Hinprimer | MWG BioTechAG, München, D |
| • Sequenz: 5' – ATTTATTTTGTCTTCTCCCA – 3' | |
| - CD45RA Rückprimer | MWG BioTechAG, München, D |
| • Sequenz: 5' – GTTAACAACCTTTTGTGTGCCAAC – 3' | |

- | | |
|---------------------------|------------------------------------|
| - DNA-Längenstandard | BAG, Lich, D |
| • phi x 174-HAE III | |
| - Ethidiumbromid | Inno-Train Diagnostik, Kronberg, D |
| - Gel Loading Solution | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| - MetaPhor Agarose | Cambrex Bio Science, Rockland, USA |
| - Natriumacetat-Puffer-II | Zentralapotheke der Uniklinik Jena |
| - PCR Master Mix | Qiagen, West Chester, USA |
| - PHAGOTEST | ORPEGEN Pharma, Heidelberg, D |
| bestehend aus: | |
| • DNA-Färbelösung | |
| • FITC-opsonierte E.coli | |
| • Lyselösung | |
| • Quenching-Lösung | |
| • Waschlösung | |
| - Restriktionsenzym MspI | Roche Diagnostics, Mannheim, D |
| • Schnittstelle: C*CGG | |
| - L-Puffer | Roche Diagnostics, Mannheim, D |
| - Tris-Boratpuffer | Zentralapotheke der Uniklinik Jena |

4.2.3 Verbrauchsmaterialien

- | | |
|-------------------------------|---------------------------------|
| - Aqua ad injectabilia (10ml) | Braun, Melsungen, D |
| - Aqua ad injectabilia (10l) | Fresenius Kabi, Bad Homburg, D |
| - Citrat – Monovette (5ml) | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| - FACS-Flow | Becton Dickinson, San José, USA |
| - FACS-Lysing Solution | Becton Dickinson, San José, USA |
| - FACS-Rinse | Becton Dickinson, San José, USA |
| - FACS-Röhrchen | Becton Dickinson, Bedford, USA |
| - FACS-Safe | Becton Dickinson, San José, USA |
| - Heparin-Li-Monovette (9ml) | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| - Klebeband | 3M, St.Paul, USA |
| - PCR Sofstrips (0,2ml) | Biozym Scientific, Oldendorf, D |
| - PBS-Tabletten | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| - Pipettenspitzen | Brand, Wertheim, D |
| • 10µl, 100µl, 1000µl | |

- Pipettenspitzen im DNA-Umgang Nerbe Plus, Winsen/Luhe, D
 - 10µl, 200µl, 1000µl
- Reaktionsgefäße (1,5ml) Eppendorf, Hamburg, D

4.2.4 Geräte

- Biofuge 13 Heraeus Sepatech, Osterode, D
- Centifuge 5417 Eppendorf, Hamburg, D
- Eisbehälter Eppendorf, Hamburg, D
- Elektrophoresekammer Bio-Rad, Richmond, USA
- Erlenmeyerkolben (500 ml) Brand, Wertheim, D
- FACSCalibur Becton Dickinson, San José, USA
- Gefrierschrank
- DNA-Präparationsgerät Qiagen, Hilden, D
GenoMTM-6
- Mikrowelle Bosch, Stuttgart, D
- Peltier Thermal Cycler (PTC-225) GMI, Ramsey, USA
- Pipetten Gilson, Villiers-de-Bel, F
 - ≤ 2µl, ≤ 10µl, ≤ 200µl, ≤ 1000µl
- Pipetten für DNA-Verfahren Eppendorf, Hamburg, D
 - ½ - 10µl, 20 – 200µl, 100-1000µl
- Polaroid MP4+ Kema, Cambridge, USA
- Reaktionsgefäßständer Brand, Wertheim, D
- Spannungsgerät (Model: ¹⁰⁰⁰/₅₀₀) Bio-Rad, Richmond, USA
- Thermomixer Comfort Eppendorf, Hamburg, D
- Waage Kern, Balingen-Frommern, D
- Wasserbad (WB 14) Memmert, Schwabach, D

4.2.5 Software

- Microsoft Office Excel 2003 Microsoft Corporation, Redmont, USA
- SPSS 13.0 für Windows SPSS Inc., Chicago, USA
- BD CellQuestTM Pro Version 5.2 Becton Dickinson, San José, USA

5 Experimentelle Methoden

5.1 Herstellung von Lösungen

5.1.1 Herstellung von PBS

Zur Herstellung von PBS (pH=7,4) wurden 5 PBS-Tabletten der Firma Sigma in 1l Aqua ad injectabilia (Fresenius Kabi) durch mehrfaches Schwenken komplett gelöst. Die fertige Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

5.1.2 Herstellung der Lyselösung

Die 10-fach konzentrierte Lyselösung (100ml) der Firma Becton Dickinson wurde durch Zugabe von 900ml Aqua ad injectabilia (Fresenius Kabi) in eine einfach konzentrierte Lösung umgewandelt. Die angesetzte Lösung lagerte bis zum Verbrauch bei Raumtemperatur.

5.2 Durchflusszytometrische Analytik

5.2.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Mit dem Durchflusszytometer ist es möglich, Eigenschaften von Zellen zu erfassen und grafisch darzustellen. Eine Trägerflüssigkeit (FACS-Flow) erzeugt eine laminare Strömung, in welcher die zu untersuchenden Zellen einen definierten Weg zurücklegen. Die Zellen passieren dabei einzeln ein Messsystem, bestehend aus einem Laserstrahl (monochromatisches Licht von 488nm), Linsen, Spiegeln, Filtern und Detektoren (Abb.3).

Kommt eine Zelle am Laserstrahl vorbei, wird das Licht je nach Zellgröße gebeugt. Die Strahlung wird in der Achse des einfallenden Lichtes detektiert (Abb.3) und heißt Vorwärtsstreulicht (FSC). An den inneren Zellstrukturen, die die Granularität der Zellen bestimmen, werden die Lichtstrahlen gebrochen und reflektiert. Dieses so genannte Seitwärtsstreulicht (SSC) wird im Winkel von 90° zu der Emissionsrichtung des Lasers aufgefangen (Abb.3). Zellen mit einer hohen Granularität brechen das Licht am stärksten. Ihr SSC-Wert ist dementsprechend hoch, sodass die Zellen in der grafischen Darstellung peripher abgebildet werden.

Da sich Leukozyten, bestehend aus Lympho-, Mono- und Granulozyten durch unterschiedliche Größe und Granularität auszeichnen, ergeben sich verschiedene Werte im FSC und SSC. Deshalb ist es möglich, durch Setzen eines Analysefensters (Gate) die gewünschte Zellpopulation isoliert zu betrachten.

Um die CD45-Expression zu untersuchen, wurden die Zellen vorher mit fluorochrommarkierten mAK angefärbt. Diese Farbstoffmoleküle senden nach Anregung durch den Laser Licht bestimmter Wellenlänge aus. Als Fluorochrome wurden FITC und PE verwendet, welche einen Emissionsgipfel von 520nm (FITC) und 576nm (PE) aufweisen. Je mehr fluoreszierende AK die AG besetzen, desto stärker die Lichtemission. Diese Lichtsignale werden durch Linsen fokussiert, mittels Filter gereinigt und an den entsprechenden Detektoren empfangen. In dieser Arbeit wurden nur zwei der drei zur Verfügung stehenden Detektoren verwendet. Nach dem Empfang der FITC-Signale am FL1-Detektor bzw. der PE-Signale am FL2-Detektor wurden diese elektronisch umgewandelt und zur Analyse an das Datenverarbeitungssystem CellQuest gesendet. Bei allen durchgeführten Messungen wurden jeweils 10.000 Signale ausgewertet.

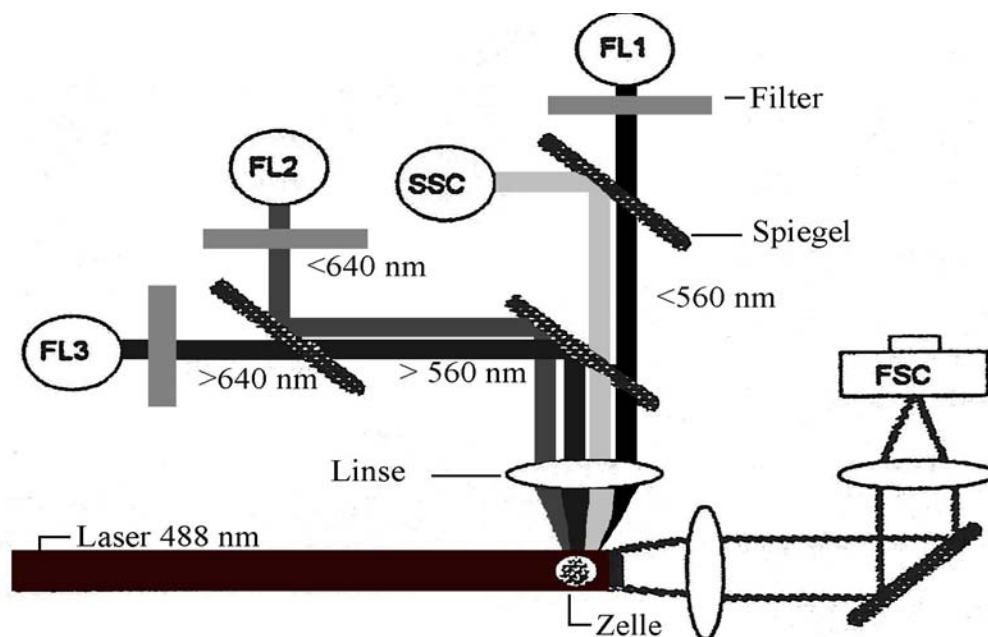


Abb. 3: optisches System der Durchflusszytometrie

(“Durchflusszytometrie am Beispiel des FACScan“, BD, modifiziert)

5.2.2 Einstellungen des Durchflusszytometers

Um eine Überschneidung des emittierten Lichtes in benachbarte Detektoren (Abb.4) und damit eine Fehlinterpretation bei Mehrfachfärbung zu verhindern, wird dieser Fehler durch Kompensationseinstellungen korrigiert. Hierbei wird die Signalmenge, die fälschlicherweise im angrenzenden Kanal gemessen wurde, von dem Gesamtsignal subtrahiert um die wahre Signalstärke am entsprechenden Detektor zu erhalten.

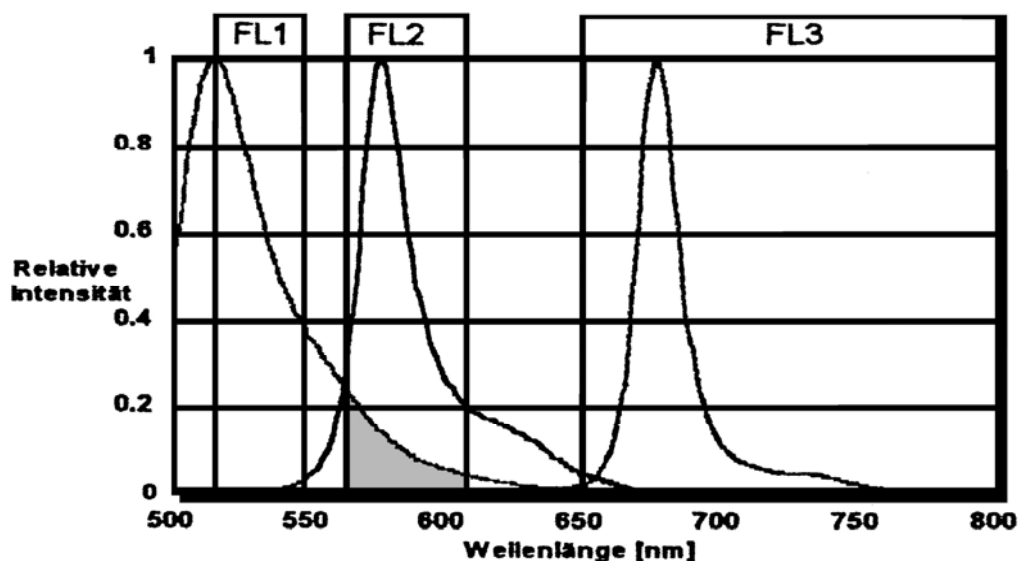


Abb. 4: Überstrahlungsbereich (grau) des Emissionsspektrums von FL1 (FITC-Detektion) in den FL2 Bereich (PE-Detektion)

("Durchflusszytometrie am Beispiel des FACScan", BD, modifiziert)

Die Kompensationen für die durchgeführten Untersuchungen waren folgendermaßen eingestellt:

FL1 – 1,1% FL2 → da 1,1% des PE-Signals in FL1 gemessen wurde

FL2 – 45,9% FL1 → da 45,9% des FITC-Signals in FL2 gemessen wurde

Alle Einstellungen am FACS-Gerät blieben unverändert und wurden für jede Analyse genutzt.

5.2.3 Anfärbung der CD45-AG von Leukozyten mit CD45-mAK

In der vorliegenden Arbeit wurde das CD45-Expressionsmuster sowohl von Lymphozyten als auch von Granulozyten, sowie die Phagozytoseaktivität der Granulozyten durchflusszytometrisch untersucht. Für diese Analysen ist die Aufbereitung des Blutmaterials erforderlich. Im Folgenden werden die dazu benötigten Arbeitsschritte erläutert.

Zum Nachweis des CD45R-Expressionsmusters (RO, RA, RB, RC) auf Leukozyten wurden pro Proband vier Ansätze vorbereitet. Hierzu wurden je 100µl Citratblut in insgesamt vier Eppendorfgefäße (Tubes) gegeben. Diese Gefäße wurden mit den verschiedenen AK versetzt, um Exon A-C kodierende Epitope markieren zu können. Die verwendeten Mengen der CD45RO- und CD45RA-AK beruhen auf den Ergebnissen einer Titrationsreihe, welche in der Promotionsarbeit von Dr. Kathrin Rebstock (Rebstock 2006) ermittelt wurden. Von den CD45RB- und CD45RC-AK wurden je 10µl verwendet. Diese Mengenangabe wurde vom Hersteller empfohlen.

Die vier Untersuchungsansätze wiesen neben den 100µl Blut folgende Zusammensetzung auf:

1. Ansatz → keine AK-Zugabe, diente als Negativkontrolle
2. Ansatz → 2µl CD45RA-AK + 2µl CD45RO-AK + 16µl PBS
3. Ansatz → 10µl CD45RB-AK + 10µl PBS
4. Ansatz → 10µl CD45RC-AK + 10µl PBS

Nachdem die zugegebenen Materialien mit dem Blut vermischt wurden, inkubierten die Eppendorfgefäße bei Raumtemperatur für 30min im Dunkeln. Während dieser Zeit bildeten sich zwischen AK und den Leukozyten AG-AK-Komplexe aus.

Anschließend wurden alle Gefäße mit 10%iger Lyselösung auf 1,5ml aufgefüllt und mit dem Blut vermengt. Dieses Gemisch wurde für 10min im Dunkeln bei Raumtemperatur belassen und mehrmals geschüttelt, um eine gute Verteilung der Lyselösung und somit die Destruktion aller Erythrozyten zu erzielen. Nach der Inkubationszeit folgte eine Zentrifugation für 5min bei 5500U/min. Daraufhin wurden die Überstände durch vorsichtiges Abpipettieren von den am Boden verbliebenen Sedimenten (Pellets) entfernt. Zwei Waschvorgänge, welche das

Suspendieren der Zellbestände in je 1ml PBS, das Zentrifugieren für 5min bei 5500U/min und das Verwerfen der Überstände umfassten, schlossen sich an. Die verbliebenen Pellets wurden schließlich mit je 200µl PBS in Lösung gebracht und in entsprechend gekennzeichnete FACS-Röhrchen überpipettiert. Sie standen nun der durchflusszytometrischen Analyse zur Verfügung.

5.2.4 Isotypkontrollen für die verwendeten CD45-AK

Es ist denkbar, dass die verwendeten CD45-AK auch unspezifisch an humane Leukozyten binden, so dass das Messergebnis verfälscht wird. Um falsch positive Werte durch solche unspezifischen Bindungen zu vermeiden und die betroffenen Proben von der weiteren Auswertung auszuschließen, wurde bei den durchgeführten Untersuchungen je eine Isotypkontrolle mitgeführt. Für jeden verwendeten CD45-AK wurde ein entsprechender Isotypkontroll-AK eingesetzt. Die Kontroll-AK haben die besondere Eigenschaft, dass sie gegen ein Epitop gerichtet sind, welches sich nicht auf humanen Leukozyten befindet, sie jedoch den gleichen Isotyp wie die entsprechenden CD45-AK besitzen. Dadurch können unspezifische Bindungen der CD45-AK erfasst und kontrolliert werden. Die Durchführung der Isotypkontrolle erfolgte parallel zu den bereits bei der Probenanalyse beschriebenen Methoden, unter den gleichen Bedingungen und mit den gleichen AK-Konzentrationen und -Volumina wie bei den CD45R-AK. Zur Kontrolle des PE-CD45RO-AK mit dem Isotyp Maus IgG_{2a} wurde der PE-markierte Maus-IgG_{2a}-Antikörper verwendet. Die Überprüfung des FITC-CD45RA-AK mit dem Isotyp Maus IgG_{2b} erfolgte mit einem FITC-IgG_{2b}-AK der Maus. Da die verwendeten CD45RB-AK und CD45RC-AK den gleichen Isotyp besaßen, wurde für beide derselbe Maus-IgG₁-AK (FITC-markiert) benutzt.

5.2.5 Bestimmung der Phagozytoseaktivität von Granulozyten

Für diesen Untersuchungsansatz wurden die Bestandteile des Phagotest Sets der Firma Orpegen Pharma verwendet. Ausnahmen sind in den Ausführungen hervorgehoben.

Nach vorsichtigem Schütteln der Heparin-Li-Monovetten wurden je 100µl Blut in insgesamt fünf Reaktionsgefäße gefüllt. Die Gefäße wurden für 10min in einem Eisbehälter vorgekühlt, welcher 20min vor Gebrauch aus einem Tiefkühlschrank (-35°C) genommen wurde. Anschließend wurde je 20µl FITC-opsonierte E. coli-

Lösung zügig beigemischt. Durch die niedrige Temperatur des Blutes war die Phagozytoseaktivität der Granulozyten auf ein Minimum reduziert, sodass kaum Bakterien von den Granulozyten aufgenommen werden konnten. Erst bei einer Temperaturerhöhung konnte dieser Vorgang ablaufen. Der Zeitpunkt der Temperaturerhöhung wurde daher als Startpunkt für die Phagozytoseaktivität festgelegt.

Vier der fünf Gefäße wurden dafür in 37°C warmes Wasser gegeben. Dort verweilten sie 1; 2,5; 5 und 10min. Das fünfte wurde als Vergleichswert für 10min im Kühlbehälter belassen (Tab.2).

Alle Eppendorfgefäße wurden nach Ablauf ihrer jeweiligen Inkubationszeit mit je 100µl gekühlter Quenchlösung versetzt. Damit wurde die Phagozytose der Bakterien durch die Granulozyten gestoppt. Bis zum vollständigen Durchlauf des gesamten Ansatzes verweilten die bereits gequenchten Reaktionsgefäße im Eisbehälter (Tab.2).

Tab. 2: Verweildauer der einzelnen Gefäße im Eisbehälter und im Wasserbad

<i>Gefäß</i>	<i>Zeit (min)</i>	<i>Temperatur/Ort</i>	<i>Zeit nach Quenchen bis Waschvorgang</i>
1	10	Eisgefäß	Eisgefäß
2	1	37 °C Wasser	Eisgefäß
3	2,5	37 °C Wasser	Eisgefäß
4	5	37 °C Wasser	Eisgefäß
5	10	37 °C Wasser	Eisgefäß

Nach dem Stoppen der Phagozytoseaktivität wurden alle Behältnisse mit Waschlösung bis auf 1,5ml aufgefüllt und bei 4°C mit 1600U/min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Ansätze nochmals gewaschen.

Durch Auffüllung der Gefäße auf 1,5ml mit Lyselösung und 20-minütiges Einwirken dieser bei Raumtemperatur kam es zur Zerstörung der Erythrozyten. Es schloss sich eine weitere Zentrifugation (1600U/min bei 4°C) an. Der Überstand wurde entfernt, die verbliebenen Zellen mit Waschlösung aufsuspendiert und gewaschen.

Anschließend wurde 200µl DNA-Färbelösung dazugegeben. Die Proben inkubierten für 10min im Eisgefäß. In diesem Prozess wurde sämtliches

genetisches Material, welches sich in der Probe befand, markiert (Orpegen 7/96). Das ermöglichte während der durchflusszytometrischen Messung das Auswählen der Ereignisse nach ihrem DNA-Gehalt, welcher mindestens dem Gehalt einer normalen diploiden Zelle entsprechen sollte. Somit konnten Bakterienaggregate, welche die gleichen Streuungseigenschaften wie Leukozyten besitzen (Orpegen 7/96), ausgeschlossen werden.

Abschließend wurden 200µl PBS der Firma Sigma-Aldrich beigefügt und die Mischungen in FACS-Röhrchen umgefüllt, um sie der Analyse durch das FACSCalibur zu unterziehen.

5.3 DNA-Analytik

5.3.1 Präparation der DNA aus Vollblut

Aus dem verbliebenen Citratblut wurden 320µl entnommen und in die Reaktionsgefäße des DNA-Präparationsgerätes GenoMTM-6 pipettiert, um daraus die DNA zu isolieren. Der Isolationsprozess wurde automatisch in dieser Maschine bearbeitet. Nach Befüllung des Gerätes mit maximal sechs Proben vollzog sich der Arbeitsprozess in mehreren Schritten (zusammenfassend in Abb.5 dargestellt):

1. Lyse der Blutzellen durch Zusatz von chaotropen Substanzen (Guanidium-Thiocyanat – GTC)
2. Zugabe von magnetischen Partikeln (magnetic beads) und Bindung dieser an die DNA in Anwesenheit der chaotropen Substanzen
3. Anlegen eines magnetischen Feldes und damit Fixierung der an die magnetischen Partikel gebundenen Genombestandteile
4. Verwurf der ungebundenen Substanzen
5. Waschvorgang in Ethanol zur Entfernung der chaotropen Substanzen (GTC)
6. Spülung mit destilliertem Wasser zur Entfernung des Alkohols, dadurch Lösung der DNA von magnetischen Partikeln
7. Induktion eines magnetischen Feldes zur Entfernung der 'magnetic beads'
8. gereinigte DNA ist in destilliertem Wasser gelöst

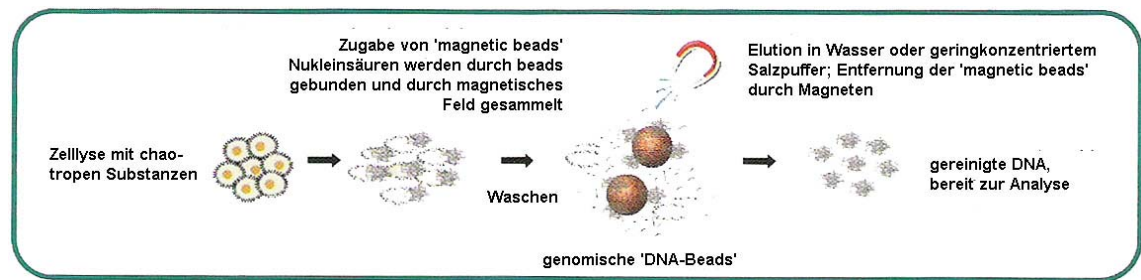


Abb. 5: Übersicht über die Arbeitsschritte zur DNA- Präparation

(GenoVision 2004, modifiziert)

Nach etwa 20min konnte die DNA (200µl), die pro Proband in einem Reaktionsgefäß verweilte, entnommen werden. Die Gefäße wurden fest verschlossen und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Vor- und Nachbereitungen sowie die Bedienung des Gerätes wurden von Mitarbeitern des transplantationsimmunologischen Labors des Instituts für Transfusionsmedizin durchgeführt.

5.3.2 Nachweis der C→G Punktmutation an Position 77 des Exon A des CD45-Gens

Die Prüfung auf Vorhandensein einer Punktmutation an Position 77 gliederte sich in mehrere Einzelschritte, die im Folgenden kurz aufgelistet sind und in den Unterpunkten näher erläutert werden.

1. Vermehrung des entsprechenden Genabschnitts durch die Polymerasekettenreaktion (5.3.2.1)
2. Gießen von Agarosegelen für die Elektrophoresen (5.3.2.2 und 5.3.2.3)
3. Elektrophorese zum Nachweis der PCR-Amplifikate (5.3.2.4)
4. Fotodokumentation des Ergebnisses (5.3.2.5)
5. Vorbereitungen zum DNA-Verdau (5.3.2.6)
6. Verdau der DNA in der RFLP-Analyse (5.3.2.7)
7. Elektrophorese zum Nachweis des Mutations- bzw. Wildtyps mit anschließender Fotodokumentation des Ergebnisses (5.3.2.8)

5.3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der PCR wird mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), synthetisch hergestellter Oligonukleotide (Primer) und Desoxyribonukleotiden in mehreren thermischen Reaktionszyklen der entsprechende DNA-Bereich amplifiziert. Ein Zyklus besteht aus 3 Komponenten:

1. Denaturierung der DNA-Doppelstränge bei 94°C.
2. Anlagerung der zuvor zugefügten Primer an ihre komplementären Stränge im Bereich des CD45-Gens durch Abkühlung auf 55°C.
3. DNA-Synthese, dabei lagert die Taq-Polymerase die komplementären Basen bei 72°C an den parentalen Strang an.

Für den PCR-Ansatz wurde pro Proband 18µl DNA mit 15µl Mastermix [enthält 200µM Desoxyribonukleotide (dNTP) und PCR-Puffer, bestehend aus 50mM KCl; 1,5mM MgCl₂; Glycerol 5%; 10mM Tris-HCl (pH=8,3); 100µg/ml Cresol Red; 0,001% m/v Gelatine] (Olerup 2003), 1,5µl (5U/µl) Taq-Polymerase sowie je 3µl der jeweiligen in Kapitel 4.2.2 aufgelisteten Hin- und Rückprimer vermischt. Anschließend wurden die Gefäße fest verschlossen, um ein Verdampfen des Materials in der sich anschließenden PCR zu verhindern. Die Amplifikation wurde von dem automatischen Thermozykler PTC-225 nach dem Protokoll in Tab.3 durchgeführt. Dieser Ablauf ist in der Publikation von Mitterski et al. (2002) beschrieben.

Tab. 3: Amplifikationsprotokoll – Einzelschritte der PCR-Reaktion

Schritt	Zeitspanne in sek	Temperatur (°C)
1	300	94
2	20	94
3	60	61
4	60	72
5	20	94
6	60	58
7	60	72
8*	20	94
9*	60	55
10*	60	72
83	300	72
84	bis Probenentnahme	4

* Die Schrittfolge 8, 9, 10 wurde insgesamt 25-mal aufeinanderfolgend wiederholt.

5.3.2.2 Herstellung des Elektrophoresegels zum Nachweis der PCR-Produkte

Für den Nachweis der PCR-Amplifikate wurde ein 2%-iges Agarosegel gegossen. Agarose ist ein neutrales Polysaccharid, welches nach Auspolymerisation ein Gitternetz bildet. Die Konzentration der Agarose bestimmt dabei die Dichte dieses Netzes und somit den Gelwiderstand, der die Wanderung der DNA-Fragmente durch das Gel im elektrischen Feld behindert. Daraus resultiert eine langsamere Fortbewegung größerer Moleküle im Vergleich zu kleineren. Es kommt zur Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe. Diese wird durch die Anzahl ihrer Basenpaare bedingt.

Durch die Zugabe von Ethidiumbromid (0,7mg/ml) in das Gel und die Einlagerung dieses Farbstoffes in die DNA können DNA-Moleküle sichtbar gemacht werden, da diese Chemikalie fluoreszierende Eigenschaften nach Anregung mit UV-Licht aufweist.

Zur Herstellung dieses Gels wurden 8g Agarose mit 400ml Tris-Borat-Puffer (enthält 109g Tris, 54,4g Borsäure und 3,7g EDTA in 1l Aqua destillata; pH=8-8,4) in einem Erlenmeyerkolben vermengt und bei 900W für 5min in der Mikrowelle erhitzt. Nach Reduktion der Leistung auf 180W verblieb das Gemisch weitere 10min in der Mikrowelle. Anschließend wurden 150µl Ethidiumbromid (0,7mg/ml) zugegeben und durch vorsichtiges Schwenken des Erlenmeyerkolbens mit dem heißen Gel vermischt. Das Gemenge wurde nun in den Gelträger gegossen, welcher vorher mit Klebeband abgedichtet und mit Kämme bestückt wurde.

Innerhalb einer Stunde vollzog sich die Auspolymerisation des Gels bei Raumtemperatur. Klebeband und Kämme, welche regelmäßige Vertiefungen im Elektrophoresegel hinterließen, wurden nach einer Stunde entfernt, der Gelträger in die Elektrophoresekammer eingelegt und mit Tris-Borat-Puffer übergossen.

Das Gel stand nun dem weiteren Untersuchungsablauf zur Verfügung.

5.3.2.3 Herstellung des Elektrophoresegels zur Auftrennung der RFLP-Fragmente

Bei der Herstellung des Elektrophoresegels zur Auftrennung der RFLP-Fragmente wurde die Metaphor-Agarose verwendet. Diese zeigt eine bessere Trenneigenschaft als die Agarose, die für den Nachweis der PCR-Produkte Verwendung gefunden hat. Der Gelwiderstand ist bei der Metaphor-Agarose größer, wodurch eine bessere Auftrennung der DNA-Moleküle ermöglicht wird. Für die Erzeugung des Gels wurden 8g Metaphor-Agarose mit 200ml Tris-Borat-Puffer vermengt. Nach 15min Quellzeit wurde das Gemisch unter Vermeidung von Kochen bis zum vollständigen Lösen der Agarose langsam und vorsichtig in der Mikrowelle erhitzt. Das Gießen erfolgte gemäß den Angaben in Punkt 5.3.2.2.

5.3.2.4 Elektrophorese zur Überprüfung des Amplifizierungsergebnisses

Nach Gießen des entsprechenden Gels (siehe 5.3.2.2) und Beendigung der PCR (siehe 5.3.2.1) wurden 8µl jeder Probe in je eine Gelvertiefung pipettiert - zur Kontrolle, ob in der PCR ein spezifisches Amplifikat erzeugt worden ist. Um die Identifikation des Amplifikates vornehmen zu können, wurde in jeder Reihe 8µl eines DNA-Längenstandards mitgeführt. Dieser lieferte definierte Fragmentlängen mit 1353bp, 1070bp, 872bp, 603bp, 310bp, 281bp, 271bp, 234bp, 194bp, 118bp und 72bp.

Die DNA-Amplifikate, welche durch die Phosphatgruppen der Nukleotide bei einem pH von 8-8,4 des Laufpuffers negativ geladen sind, wanderten auf Grund der angelegten Spannung von 256V durch das Trennmedium (Agarosegel) zu der positiven Anode. Während dieser Wanderung interkalierte das Ethidiumbromid mit der doppelsträngigen DNA. Dadurch wurde die Fluoreszenz im Vergleich zum freien Farbstoff im Gel intensiviert, sodass die DNA-Moleküle später im UV-Licht zu erkennen waren.

Nach 20-minütiger Elektrophorese mit 256V wurde das Gel entnommen und der Fotodokumentation zugeführt.

5.3.2.5 Fotodokumentation

Hierbei wird die fluoreszierende Eigenschaft des Ethidiumbromids im UV-Licht ausgenutzt. Das Gel wurde auf den Beleuchtungstisch der Polaroidvorrichtung

gelegt und mit UV-Licht der Wellenlänge 366nm bestrahlt. Die aufleuchtenden DNA-Banden waren ein Hinweis auf eine erfolgreiche PCR. Bei Blende 8, einer Belichtungszeit von 1sek und einem Abstand des Gels vom Fotopapier von 60cm wurde ein Foto angefertigt, welches eine Entwicklungszeit von 1min benötigte. Die Dokumentation der PCR war damit abgeschlossen.

5.3.2.6 Vorbereitungen zum DNA-Verdau

Um eine Restriktion der DNA zu ermöglichen, musste diese zuvor aus dem PCR-Ansatz gefällt werden. Dazu wurden je 30µl des PCR-Ansatzes in Eppendorfgefäße umgefüllt und mit 3µl Natriumacetatlösung (3molar, pH=5,2) sowie mit 75µl 96%-igem Alkohol versetzt. Diese Mischung ermöglichte die Fällung der DNA, welche sich über Nacht im Tiefkühlschrank bei -32°C vollzog. Die Proben wurden am nächsten Tag nach mindestens 12h Fällungszeit für 15min bei Raumtemperatur und 13.000U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das verbliebene DNA-Protein-Sediment mit 200µl 80%-igem Alkohol bei oben genannten Zentrifugationswerten gewaschen, wodurch der Proteinanteil in Lösung gebracht wurde. Der Überstand wurde nochmals verworfen und die Gefäße offen eine halbe Stunde im Raum stehen gelassen, damit die restlichen Alkoholbestände verdunsten konnten.

5.3.2.7 RFLP-Analyse

Die C→G Punktmutation an Position 77 im Exon A des CD45-Gens generiert eine neue CCGG-Schnittstelle, die von dem Verdauungsenzym MSPI erkannt und getrennt wird (siehe Abb.13).

Voraussetzung für die Durchführung der RFLP-Analyse ist die Amplifizierung des entsprechenden Genabschnitts (siehe 5.3.2.1) und die Ausfällung der DNA (siehe 5.3.2.6). Nach Ablauf dieser Schritte wurden pro Ansatz je 1µl Puffer L, 1µl (10U) MspI-Enzym und 8µl Aqua ad iniectionem der Firma Braun hinzugegeben. Der DNA-Verdau durch das Enzym fand innerhalb von 4h statt, in denen die Gefäße bei 37°C und 1000U/min im Schüttler inkubierten.

Nach dem Verdau wurden die Proben für 1min bei 3000U/min ancentrifugiert um die Flüssigkeit, die sich auf Grund von Verdunstungs- und Kondensationsprozessen in den oberen Gefäßabschnitten gesammelt hat, am Boden des Reaktionsgefäßes zu konzentrieren.

5.3.2.8 Elektrophorese zum Nachweis der postrestriktionären DNA-Fragmente und Fotodokumentation

Die Reaktionsgefäße mit dem Probenmaterial wurden mit je 2,5µl Gel Loading Solution [bestehend aus 10mmol/l Tris-HCl, 10mmol/l MgCl₂, 1mmol/l Dithiothreitol (pH=7,5)] versetzt. Dies führte zum Beschweren der DNA und verhinderte somit die Verflüchtigung des Genmaterials aus den Gelöffnungen, da anschließend 10µl des verdauten Probenmaterials in die Gelkammern gefüllt wurden.

Nach 40-minütiger Elektrophorese bei 256V wurde das Ergebnis mit einem Foto dokumentiert (siehe 5.3.2.5).

6 Statistische Methoden

6.1 Statistik – CD45R-Expressionsmuster

Um eine Aussage über signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Probandengruppen bezüglich ihres exprimierten CD45-Musters (RO, RA, RB, RC) treffen zu können, musste zunächst ein Test auf Normalverteilung durchgeführt werden. Zur Beurteilung der Verteilung wurde bei mehr als 50 Probanden in einer Gruppe der Kolmogorov-Smirnov-Test herangezogen.

Das Signifikanzniveau α wurde mit $\alpha=0,1$ festgelegt. War die Überschreitungswahrscheinlichkeit p (vom Signifikanzniveau α) $<0,1$, lag keine Normalverteilung vor. Dementsprechend wurde hier der U-Test angewandt. Ergab sich ein p -Wert von $>0,1$, durfte der T-Test für unabhängige Stichproben verwendet werden.

Zur Beurteilung des T-Tests musste vorher entschieden werden, ob die Varianz gleich oder ungleich ist. Dies wurde aus dem Levene-Test ersichtlich. War hier $p>0,05$ so galten die Varianzen als gleich. Der p -Wert des T-Tests durfte nun in dieser Spalte abgelesen werden.

Für den T-Test und U-Test war α mit 0,05 festgelegt, sodass sich bei einem errechneten $p<0,05$ auf eine statistische Signifikanz schließen lässt, da die Nullhypothese H_0 [H_0 = Es besteht kein Unterschied im exprimierten CD45R-Muster (RO, RA, RB, RC) zwischen den Probandengruppen] abgelehnt wird. Analog war kein signifikantes Ergebnis bei $p>0,05$ vorhanden, H_0 wurde in diesem Fall angenommen.

6.2 Statistik – Granulozytenfunktion

Zur Feststellung ob ein Unterschied der Phagozytoseaktivitäten zwischen den verschiedenen Gruppen besteht, war es auch hier nötig zuerst einen Test auf Normalverteilung durchzuführen. Da bei dieser Fragestellung die beteiligten Gruppen durch weniger als 50 Probanden gebildet wurden, kam in diesem Fall der Shapiro-Wilk-Test zur Beurteilung der Normalverteilung in Betracht. Die Signifikanzgrenze lag bei diesem Test parallel zum Kolmogorov-Smirnov-Test bei 0,1. Das weitere Vorgehen ist in Punkt 6.1 beschrieben.

Um die Frage zu klären, ob die Granulozytenfunktion von der Inkubationszeit im warmen Wasser abhängig ist, wurde der Friedman-Test durchgeführt. Dieser untersucht je zwei benachbarte Messpunkte und trifft eine Aussage, ob es innerhalb der Gruppe einen signifikanten Unterschied der Aktivitäten gibt. Zur genaueren Lokalisation einer gefundenen Abweichung musste der Wilcoxon-Test ausgeführt werden. Das Signifikanzniveau α lag in beiden Tests bei 0,05. Die Testentscheidung zur Ablehnung oder Annahme von H_0 wurde auch in dieser Untersuchung, parallel zu Punkt 6.1 mit Hilfe des p-Wertes getroffen.

6.3 Statistik – Mutationshäufigkeit

Zur Überprüfung einer Assoziation zwischen der Punktmutation und dem Auftreten der HT im Vergleich zum Kontrollkollektiv wurde der doppelseitige Fisher-Exakt-Test verwendet. Er wurde gewählt, da er im Gegensatz zum χ^2 -Test auch bei wenigen Beobachtungen angewendet werden kann.

In einer Kontingenztafel werden die gefundenen Ereignisse (normales/variantes CD45-Expressionsmuster bzw. Wildtyp-/Punktmutationsträger) in den jeweiligen Kollektiven (Patienten-, Kontrollkollektiv) dargestellt. Der Test berechnet für die Zellhäufigkeiten (aus der Kontingenztafel ersichtlich) die bedingte Wahrscheinlichkeit.

Bei einem festgelegten Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ ergibt sich aus einem errechneten $p>0,05$ keine signifikante Assoziation der Merkmale 'Punktmutation an Position 77 im Exon A des CD45-Gens' und 'Hashimoto-Thyreoiditis'.

7 Ergebnisse

7.1 Altersstruktur und Geschlechtsverhältnis in den Kollektiven

Die Geschlechtsverteilung und Altersstruktur der untersuchten Individuen ist in Tab.4 dargestellt.

Tab. 4: Geschlechts- sowie Altersstruktur in den verschiedenen Kollektiven

(Angabe des Alters in Jahren, * Granulozytenfunktionstest)

		<i>Patientenkollektiv</i>			<i>Kontrollkollektiv</i>		
		<i>Weibl.</i>	<i>Männl.</i>	<i>Summe</i>	<i>Weibl.</i>	<i>Männl.</i>	<i>Summe</i>
CD45	<i>Anzahl</i>	64	9	73	29	44	73
	<i>Durchschnittsalter</i>	46	53	47	37	33	34
	<i>Altersspanne</i>	17-78	32-77	17-78	19-64	19-64	19-64
GFT*	<i>Anzahl</i>	34	7	41	23	19	42
	<i>Durchschnittsalter</i>	46	53	47	37	34	35
	<i>Altersspanne</i>	17-78	32-77	17-78	19-64	20-64	19-64

Die Verteilung des Geschlechts war in den beiden Kollektiven nicht homogen. Während die Mehrzahl der HT-Patienten sowohl in der Untersuchung des CD45-Expressionsmusters als auch im GFT weiblich war, wurden in der Kontrollgruppe vermehrt männliche Probanden auf das CD45-Expressionsmuster untersucht. Im GFT war das Geschlechtsverhältnis in der Vergleichsgruppe leicht auf die feminine Seite verschoben.

Die Altersanalyse zeigt, dass die weiblichen HT-Patienten etwa 10 Jahre älter waren als die Kontrollpersonen gleichen Geschlechts. Dabei waren die männlichen Probanden aus der Patientengruppe rund 20 Jahre älter als die maskulinen Kontrollen. Eine Abhängigkeit des C77G-Polymorphismus ist bisher weder vom Alter noch vom Geschlecht beschrieben worden, sodass die ungleiche Verteilung dieser Merkmale in den Kollektiven irrelevant zu sein scheint.

7.2 Durchflusszytometrische Darstellung der Leukozytenpopulationen

Während der durchflusszytometrischen Analyse wurde bei den untersuchten Zellen neben ihrer Größe (FSC) auch ihre Granularität (SSC) erfasst. Eine Darstellung dieser zwei Eigenschaften in einem Zweiparameter-Punktehistogramm (DotPlot) lässt die einzelnen Leukozytenpopulationen (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten) erkennen (siehe Abb.6). Das Markieren separater Zellgruppen mit einem Analysefenster (Gate) machte eine getrennte Betrachtung der dadurch isolierten Populationen bezüglich des zu untersuchenden Merkmals, z.B. der CD45R-Expression möglich. Dabei wurden die Lymphozyten als G1, die Granulozyten als G2 und die Monozyten als G3 markiert. In vorliegender Arbeit wurden je nach Fragestellung nur G1 und G2 verwendet.

Resultate und Aussagen, welche die Lymphozytenfraktion betreffen, wurden auf T-Zellen übertragen, da diese 70-80% der Lymphozytenpopulation ausmachen. Das Gleiche gilt für die Neutrophilen, welche >90% der Granulozytenpopulation bilden.

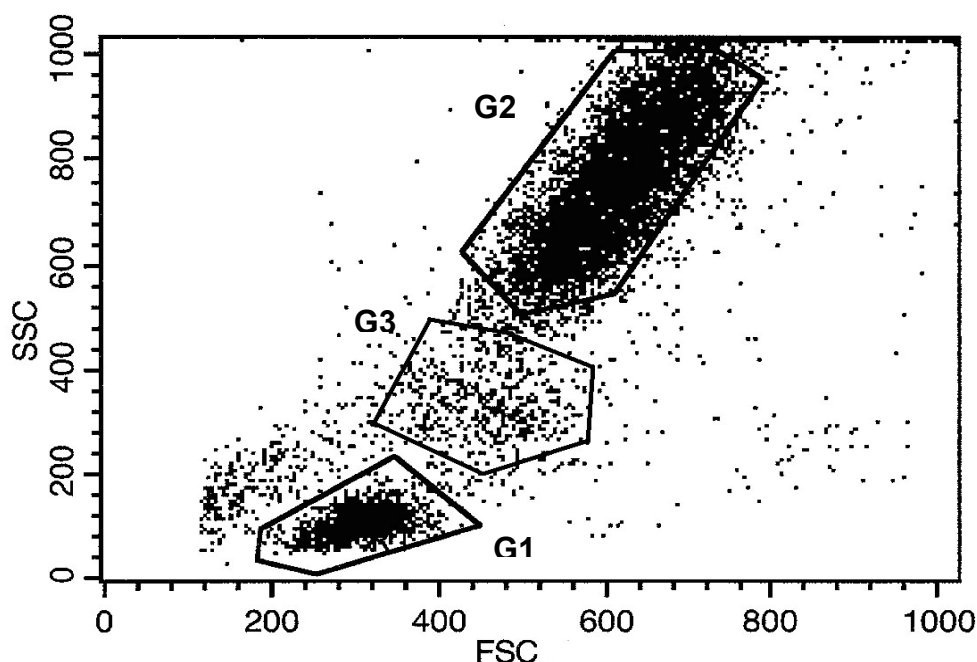


Abb. 6: Grafische Darstellung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes (FSC und SSC) für Leukozyten in einer repräsentativen durchflusszytometrischen Analyse

Es wurden insgesamt 10.000 Signale gemessen. Außerhalb der Markierungen liegende Signale stellen Zelldetritus dar.

G1–Lymphozyten G2–Granulozyten G3–Monozyten

7.3 Ergebnisse der Isotypkontrollen

Zum Ausschluss unspezifischer AK-Bindungen wurden die Isotypkontrollen durchgeführt. Ergibt sich in der Auswertung der Durchflusszytometrie eine nahezu deckungsgleiche Kurve zwischen der Isotypkontrolle und der Negativkontrolle (keine AK-Zugabe), geht daraus hervor, dass keine unspezifischen Bindungen der verwendeten, isotypidentischen CD45R-AK existieren. Eine solche unspezifische Bindung würde eine deutliche Rechtsverschiebung der Isotypkontrolle gegenüber der Negativkontrolle bedingen.

Abb.7 zeigt sowohl in der Lymphozyten- als auch Granulozytenpopulation deckungsgleiche Fluoreszenzintensitäten der Isotypkontrollen (rote Linie) gegenüber dem Leerwert (schwarze Linie). Die verwendeten Isotyp-AK gehen mit den Leukozyten keine relevanten unspezifischen Bindungen ein, sodass die Ergebnisse, die mit den CD45-AK erzielt wurden auf spezifischen Bindungen beruhen und daher aussagekräftig sind.

Der Nachweis von spezifischen Bindungen gelang bei allen Messungen, sodass keine der untersuchten Personen nachträglich ausgeschlossen werden musste.

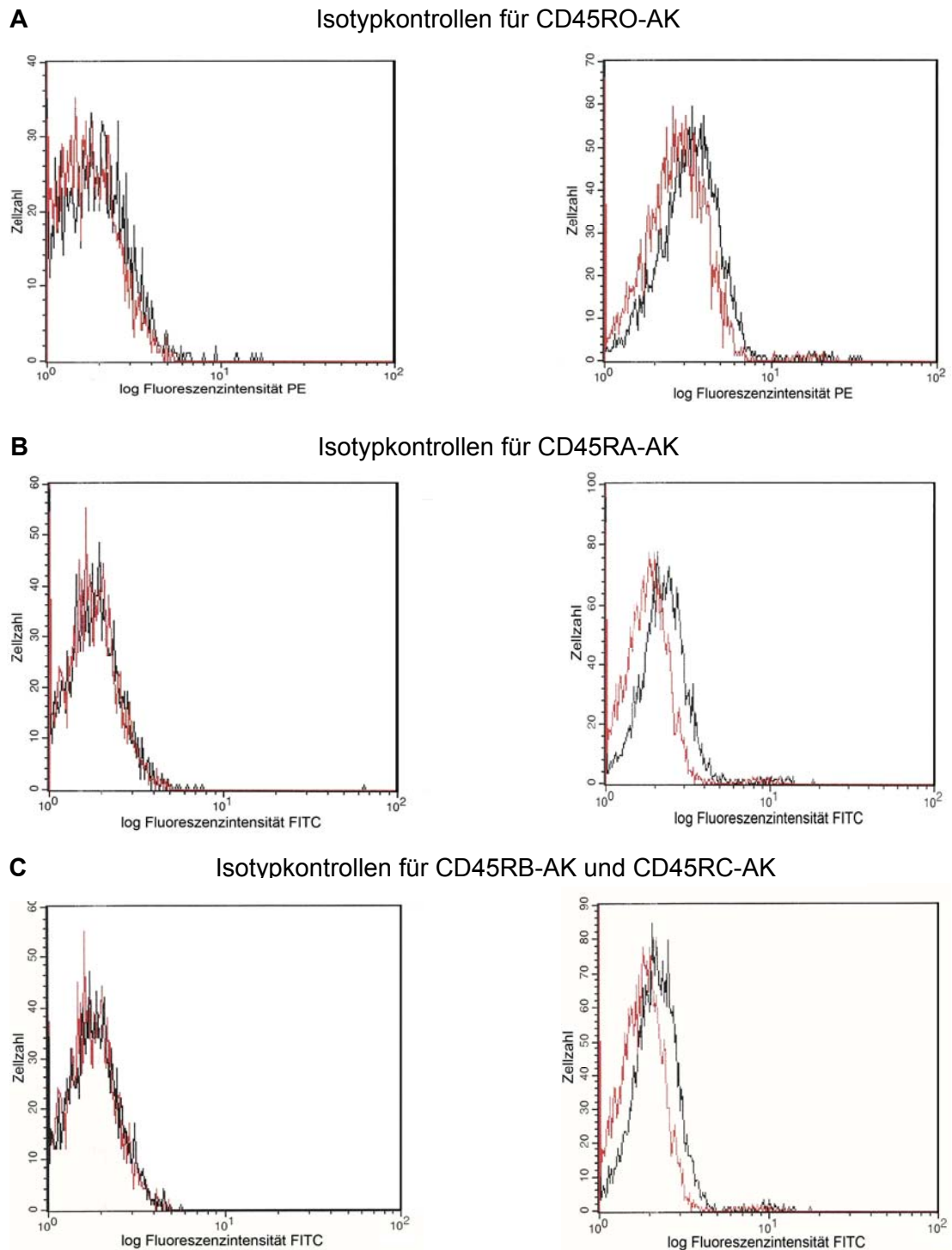


Abb. 7: Repräsentative Histogramme für Isotypkontrollen der CD45-AK

Darstellung der Fluoreszenzintensität der Lymphozyten (Diagramme links) und der Granulozyten (Diagramme rechts). Die Negativkontrolle ist durch die schwarze und die Isotypen durch die rote Linie gekennzeichnet.

A – Verwendung von 2 μ l PE – Maus - IgG_{2a} – Isotyp-AK

B – Verwendung von 2 μ l FITC – Maus - IgG_{2b} – Isotyp-AK

C – Verwendung von 10 μ l FITC – Maus - IgG₁ – Isotyp-AK

7.4 Grundlagen der CD45RO/RA-Expression auf Lymphozyten und Granulozyten

Um die Expression von CD45RO und CD45RA auf Leukozyten zu erfassen, wurden die Zellen mit einem CD45RO-mAK und einem CD45RA-mAK angefärbt. Beide AK wurden in einem Ansatz verwendet, sodass die Untersuchung als Doppelmarkierung durchgeführt wurde. Dieses Vorgehen war nötig, um das durch den C77G-Polymorphismus verursachte variante CD45RA-Expressionsmuster auf Lymphozyten zu erkennen. Es zeichnet sich im Gegensatz zum klassischen Muster durch eine stark minimierte Zellzahl mit CD45RO⁺/RA[○]-Markierung aus. Durch die grafische Wiedergabe der Ergebnisse im DotPlot war die Beurteilung der CD45RO/RA-Expression möglich. Das Zweipunktediagramm wurde in Quadranten eingeteilt (siehe Abb.8-11).

Zellen im Quadranten I sind durch keinen der beiden AK markiert worden. CD45RO[○]/RA⁺-Zellen im Quadranten II sind naive T-Zellen, welche bisher keinen AG-Kontakt hatten. Erfolgt die Aktivierung durch AG-Kontakt, wird zunehmend CD45RO neben CD45RA exprimiert (Quadrant IV). Der Verlust der CD45RA-Expression ist für die Memory-T-Zellen kennzeichnend. Sie werden in Quadrant III repräsentiert.

Eine Übersicht über die Zuordnung der CD45RO/RA-Expressionen zu den Quadranten sowie zur Lymphozyteneigenschaft ist im Folgenden zu sehen.

Quadrant I	CD45RO [○] /RA [○]	unmarkierte Zellen
Quadrant II	CD45RO [○] /RA ⁺	naive T-Zellen (noch kein AG-Kontakt)
Quadrant III	CD45RO ⁺ /RA [○]	Memory-T-Zellen (erfolgter AG-Kontakt)
Quadrant IV	CD45RO ⁺ /RA ⁺	gerade aktivierte T-Zellen, differenzieren zu Memory-T-Zellen aus

Die Quadranteneinteilung und die entsprechend zugeordneten CD45RO/RA-Markierungen gelten auch für die Granulozytenpopulation. Fraglich ist jedoch welche Zelleigenschaften dem jeweiligen CD45R-Muster zugeordnet werden können und ob ein variantes CD45RA-Expressionsmuster in dieser Zellpopulation zu finden ist.

7.4.1 Charakterisierung eines varianten CD45RA-Expressionsmusters in der Lymphozytenpopulation

Abb.8 zeigt eine exemplarische Darstellung eines klassischen CD45RO/RA-Expressionsmusters auf Lymphozyten (G1) bei einem Träger des Wildtyps. Im Vergleich dazu stellt Abb.9 das variante CD45RO/RA-Expressionsmuster der Lymphozyten bei einem Träger der C77G-Transversion dar.

In diesen Bildern ist die Zahl der unmarkierten Zellen (Quadrant I) mit 0,25% bei der Person mit dem klassischen CD45-Muster vs. 0,58% bei dem Probanden mit dem varianten CD45-Muster sehr gering. Auch die Menge der ruhenden T-Zellen (Quadrant II) unterscheidet sich nicht wesentlich voneinander (54,34% - Wildtypträger vs. 58,73% - Träger des varianten Musters). Ein markanter Unterschied war im Bereich der CD45RO⁺/RA⁺-Zellen (Quadrant III) zu erkennen. 38,12% standen 8,79% der Zellen, zu Gunsten der Person mit dem klassischen Muster, gegenüber. Im Quadrant IV war dieser Proband aber mit 7,29% vs. 31,72% der CD45RO⁺/RA⁺-Zellen im Nachteil.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der Träger des varianten Expressionsmusters weniger Memory-T-Zellen mit dem klassischen CD45RO⁺/RA⁺-Muster aufweist.

Es wurden insgesamt zwei Personen mit einem varianten CD45RA-Expressionsmuster gefunden. Je Einer entstammte dem Patienten- bzw. Kontrollkollektiv.

7.4.2 Charakterisierung eines varianten CD45RA-Expressionsmusters in der Granulozytenpopulation

Ein variantes CD45RA-Expressionsmuster bei Granulozyten wurde bisher in der Literatur nur unzureichend beschrieben. Mit der Annahme, dass Personen mit einem varianten CD45RA-Muster auf Lymphozyten auch diesbezüglich Veränderungen auf den Granulozyten aufweisen, erfolgte die Darstellung der CD45RO/RA-Expression der letztgenannten Zellpopulation ebenfalls im DotPlot. Die Probanden, deren Werte in diesem Kapitel dargestellt werden, sind identisch mit den Personen aus Punkt 7.4.1.

Durch die Gegenüberstellung dieser Personen in Abb.10 und 11 konnten folgende Aussagen getroffen werden.

Der Granulozytenanteil im doppelt-negativen Bereich des Quadranten I (0,00% vs. 0,26%) und im CD45RO⁺/RA⁺-Sektor des Quadranten II (0,00% vs. 0,02%) unterschied sich nicht. Parallel zu den Ergebnissen in der Lymphozytenpopulation fielen Abweichungen in der Zahl CD45RO⁺/RA⁺-markierter Zellen auf. 97,78% der Granulozyten des normalen Expressionsmusters (Abb.10) und nur 62,35% der Granulozyten des varianten Expressionsmusters (Abb.11) waren für dieses Merkmal positiv. Der Granulozytenanteil im Quadranten IV war beim Träger des veränderten CD45RA-Musters mit 37,37% im Vergleich zur Person mit der Wildtypexpression (2,22% der Granulozyten) deutlich erhöht.

Den Ausführungen zufolge kann auch bei den Granulozyten ein variantes CD45RA-Expressionsmuster beschrieben werden. Seine Charakteristika gleichen dem veränderten CD45RA-Muster auf Lymphozyten.

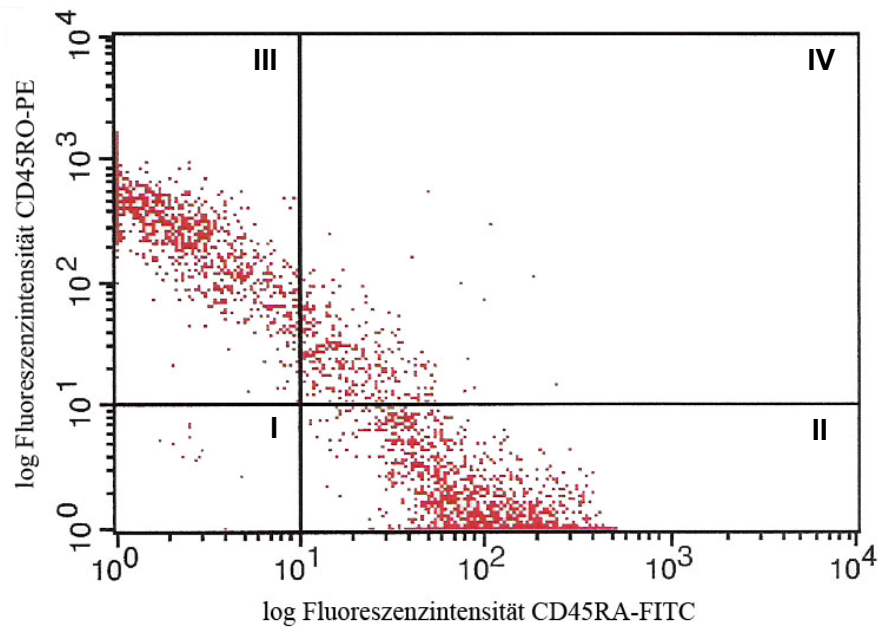


Abb. 8: Exemplarische Darstellung eines normalen CD45RO/RA-Expressionsmusters der Lymphozyten (G1)

Quadrant	Anteil der Lymphozyten (%)
I	0,25
II	54,34
III	38,12
IV	7,29

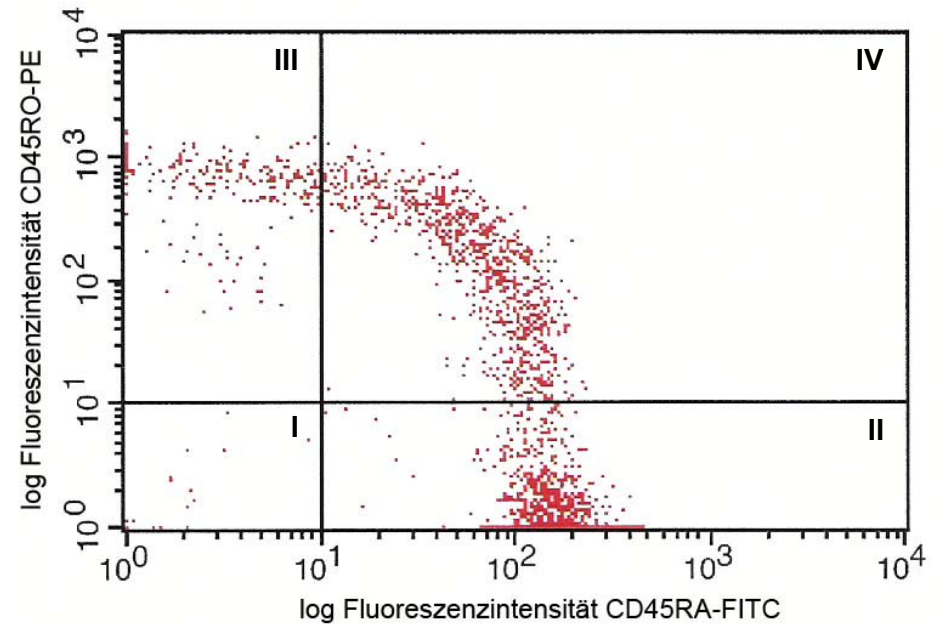


Abb. 9: Exemplarische Darstellung eines varianten CD45RO/RA-Expressionsmusters der Lymphozyten (G1)

Quadrant	Anteil der Lymphozyten (%)
I	0,58
II	58,73
III	8,79
IV	31,72

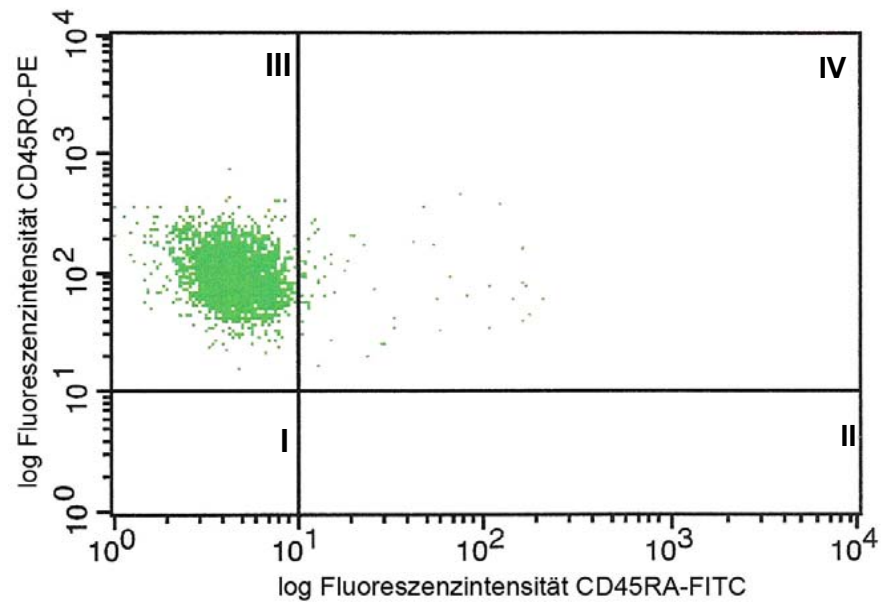


Abb. 10: Exemplarische Darstellung eines normalen CD45RO/RA-Expressionsmusters der Granulozyten

Quadrant	Anteil der Granulozyten (%)
I	0,00
II	0,00
III	97,78
IV	2,22

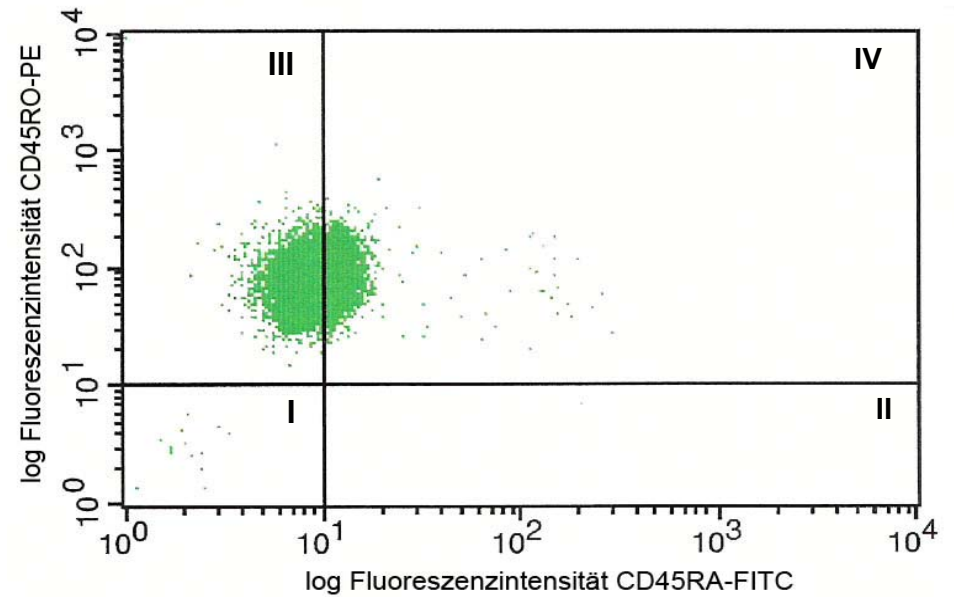


Abb.11: Exemplarische Darstellung eines varianten CD45RO/RA-Expressionsmusters der Granulozyten

Quadrant	Anteil der Granulozyten (%)
I	0,26
II	0,02
III	62,35
IV	37,37

7.5 Verteilung des klassischen und varianten CD45RA-Expressionsmuster in den Kollektiven

Es wurden insgesamt zwei Probanden gefunden, welche durch das variante CD45RA-Expressionsmuster gekennzeichnet waren. Je einer entstammte dem Patienten- bzw. Kontrollkollektiv (Tab.5).

Tab. 5: Anzahl des varianten und klassischen CD45RA-Expressionsmusters in den Kollektiven

	CD45RO/RA – Expressionsmuster		Summe
	Normal	Variant	
Patientenkollektiv	72	1 (1,37%)	73
Kontrollkollektiv	72	1 (1,37%)	73

Das variante CD45RO/RA-Expressionsmuster kam in beiden untersuchten Kollektiven mit einer Häufigkeit von ~1,37% vor. Das Ergebnis war mit $p=1$ nicht signifikant.

7.6 Molekulargenetische Resultate

Die molekulargenetische Untersuchung diente der Bestätigung, dass den, in der durchflusszytometrischen Analyse beobachteten, varianten CD45RA-Expressionsmustern tatsächlich der beschriebene Polymorphismus im CD45-Gen zu Grunde liegt.

7.6.1 Nachweis des PCR-Produktes für Exon A des CD45-Gens

Das variante CD45RA-Expressionsmuster beruht auf einer Punktmutation an Position 77 des Exon A des CD45-Gens (Thude et al. 1995, Zilch et al. 1998). Um zu überprüfen, ob bei den gefundenen varianten Phänotypen diese Mutation vorhanden ist bzw. bei Probanden mit dem klassischen CD45RA-Expressionsmuster fehlt, wurde zunächst das gesamte Exon A des CD45-Gens amplifiziert. Es wurde ein Amplifikat mit einer Länge von 260bp erwartet. Abb.12 zeigt das Resultat der Gelelektrophorese von 24 Probanden. In allen 24 Spuren bildete sich je ein Amplifikat auf gleicher Höhe ab.

Der Längenstandard, welcher in der Kontrollspur (KS) aufgetragen wurde, hinterlässt mehrere Fragmente definierter Längen (siehe 5.3.2.4). Der Vergleich mit diesen Produkten lässt eine Beurteilung der Größe der einheitlichen Amplifikate zu. Sie liegen im erwarteten Bereich von 260bp.

Das Ergebnis der 24 Probanden ist repräsentativ für alle 146 Personen, da das gesamte Patienten- und Kontrollkollektiv (mit je n=73) dieser Analyse unterzogen wurde und sich der Untersuchungsausgang nicht unterschied. In keinem Fall fand sich neben dem 260bp langen Amplifikat ein unspezifisches.

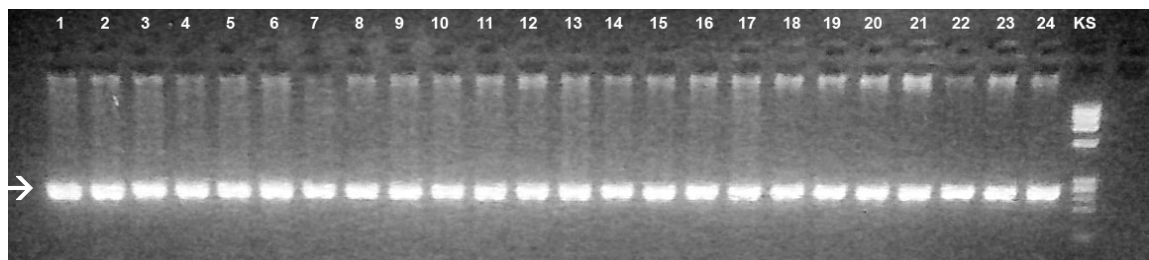
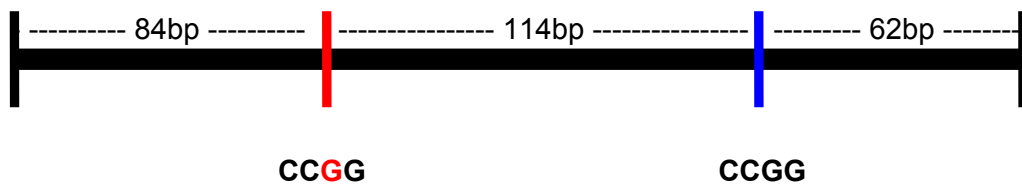


Abb. 12: Fotodokumentation von PCR-Amplifikaten für Exon A des CD45-Gens

Die Zahlen 1-24 bezeichnen Probandennummern. Sie stehen stellvertretend für alle durchgeführten Untersuchungen (n=146). Der Pfeil kennzeichnet das Amplifikat (260bp). In der Kontrollspur (KS) ist der Längenstandard aufgetragen.

7.6.2 Nachweis der gesuchten Punktmutation durch RFLP-Analyse

Um die Punktmutation im Exon A nachzuweisen, war es nötig die DNA vorher zu fällen und anschließend mit dem Restriktionsenzym *MspI* zu verdauen. Dieses Enzym erkennt und spaltet spezifisch die Frequenz CCGG, welche im untersuchten Genabschnitt in Abwesenheit der C77G-Transversion nur einmal vorkommt. Dies bewirkt, dass das 260bp umfassende Amplifikat unter Einwirkung von *MspI* in zwei Fragmente mit der Länge von 198bp und 62bp gespalten wird. Die Punktmutation, welche für das variante CD45RA-Muster verantwortlich gemacht wird, liegt an Position 77 im Exon A des CD45-Gens. An dieser Stelle wird Cytosin durch Guanin ersetzt. Damit wird zusätzlich ein neues CCGG-Sequenzmotiv kreiert, welches durch *MspI* erkannt und gespalten wird. Das 198bp umfassende Fragment wird dabei in ein 84bp und 114bp langes Bruchstück geteilt. Als Resultat des Enzymverdaus werden bei



auf, wobei die restlichen Personen (Nr.1 und 3) ein normales CD45RA-Muster hatten.

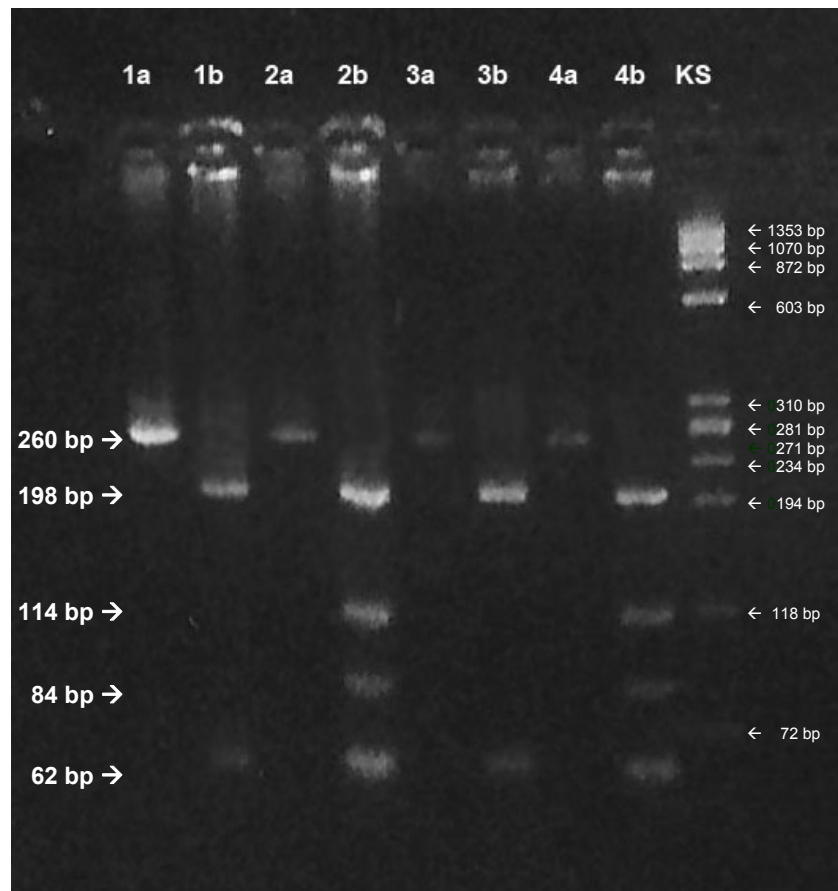


Abb. 14: Fotodokumentation zum Nachweis der Punktmutation im Exon A des CD45-Gens durch PCR-RFLP-Analyse

Die links in der Abbildung angegebenen Fragmentlängen geben die Größe der Probandenfragmente an, während die Angaben in der rechten Bildhälfte die Banden des DNA-Längenstandards identifizieren.

- a – kennzeichnet unverdautes Material
- b – kennzeichnet mit MspI verdautes Material
- 1; 2 – Probanden aus dem Patientenkollektiv
- 3; 4 – Probanden aus dem Kontrollkollektiv
- 1; 3 – Probanden mit normalem CD45RO/RA-Expressionsmuster
- 2; 4 – Probanden mit variantem CD45RO/RA-Expressionsmuster
- KS – Kontrollspur mit DNA-Längenstandard

Zu jeder Testperson wurde eine Spur amplifiziertes aber unverdautes Material mitgeführt (Spur mit 'a' gekennzeichnet). Alle Probanden wiesen in dieser Spur

nur ein Amplifikat der Länge 260bp auf. Dies diene dem Nachweis des PCR-Produktes für Exon A analog zu Punkt 7.6.1.

In der zugehörigen Spur 'b' wurde das 260bp umfassende Amplifikat derselben Person aufgetragen, welches zuvor mit dem Restriktionsenzym MspI behandelt wurde. In allen 'b'-Spuren sind Fragmente der Größe 198bp und 62bp zu finden. Diese ergeben sich durch die Spaltung der physiologischerweise vorkommenden Schnittstelle für MspI (siehe Abb.13). Es beweist, dass alle Probanden die Wildtypsequenz mindestens im heterozygoten Zustand besitzen. Gleichzeitig dient der Nachweis des 62bp langen Produktes als Kontrolle für die Funktionsfähigkeit des Restriktionsenzymes, da es bei jeder Person zu finden sein muss (siehe Abb.13).

Zusätzlich zu dem Kontrollfragment (62bp) sind in Abb.14 bei Proband Nr.2 und Nr.4 noch weitere Produkte zu erkennen. Diese entstehen durch Spaltung des 198bp großen Fragmentes, da hier eine neue Schnittstelle für MspI liegt, welche durch die C77G-Transversion geschaffen wurde. Das Restriktionsenzym greift an dem neuen Angriffspunkt an und erzeugt zwei Bruchstücke mit Größen von 114bp und 84bp.

Die Punktmutation an Position 77 wurde bei einem Probanden aus der HT-Gruppe (n=73) und bei einer Person aus dem Kontrollkollektiv (n=73) gefunden. Jeder dieser zwei Personen zeichnete sich neben der Anwesenheit der zwei Bruchstücke mit je 84bp und 114bp durch die Existenz des 198bp langen Wildtypfragments aus, sodass sie als heterozygote Träger für die untersuchte Punktmutation identifiziert werden konnten. Ein homozygoter Zustand, der durch das Fehlen des Wildtypfragmentes (198bp) gekennzeichnet ist, wurde bei keinem Untersuchten gefunden.

Beide Individuen mit der Punktmutation wiesen ein variantes phänotypisches CD45RO/RA-Expressionsmuster auf. Die verbliebenen 144 Testpersonen zeigten dasselbe Fragmentmuster, wie die Personen in Spur 1b und 3b (Abb. 14), welches homozygote Träger der Wildtypsequenz kennzeichnet. Alle 144 Probanden wiesen das klassische CD45RA-Expressionsmuster auf.

7.6.3 Gegenüberstellung der Allelfrequenzen

Die in zwei Fällen nachgewiesene Veränderung an Position 77 (Allel 77G) des CD45-Gens bedingt eine veränderte CD45RA-Expression. Ein weiteres Allel (77C) besteht in der unveränderten Form des Gens, welches ein normales CD45RA-Muster hervorruft. Im Folgenden ist das Vorkommen dieser beiden Allele (77C; 77G) in den Kollektiven gegenübergestellt (siehe Tab.6).

Tab. 6: Verteilung der Punktmutation im CD45-Gens in den Kollektiven

	Wildtyp (77C)	Mutation (77G)	Total
Patientenkollektiv	72 (98,63%)	1 (1,37%)	73
Kontrollkollektiv	72 (98,63%)	1 (1,37%)	73
Total	144 (98,63%)	2 (1,37%)	146

Die Allelfrequenz kann aus den Daten der Tab.6 nach der Berechnung von Wood et al. (Wood et al. 2002) wie folgt ermittelt werden:

$$\frac{\text{Anzahl der Ereignisse von Guanin (G) an Position 77}}{\text{Anzahl der Ereignisse von Cytosin (C) an Position 77}} = \text{Allelfrequenz}$$

Da das variante Expressionsmuster nur in heterozygoter Form gefunden wurde, ergibt sich für beide Gruppen je eine Genfrequenz von:

$$1(G)/[1(C) + 2*72(C)] = \underline{\underline{0,69\%}}$$

Das Ergebnis zeigt, dass das G-Allel in beiden Kollektiven mit einer Frequenz von 0,69% auftritt.

Da in beiden Gruppen mit der gleichen Probandenzahl die gleiche Anzahl der untersuchten Punktmutation gefunden wurde, unterscheidet sich die Häufigkeit dieser Veränderung in den Gruppen nicht ($p=1,0$). Es besteht keine Assoziation des Polymorphismus zur HT, da eine homogene Verteilung dieses Merkmals vorliegt.

7.7 Vergleich der klassischen mit den varianten CD45RA-Expressionsmustern

Nachdem Personen mit einem varianten CD45RA-Expressionsmuster gefunden und auf die C77G-Punktmutation positiv getestet wurden, soll ein detaillierter Vergleich dieser Individuen mit den restlichen Probanden ohne diesen Polymorphismus und mit der klassischen CD45RA-Expression folgen.

7.7.1 CD45RO- und CD45RA-Expression auf Lymphozyten

Um signifikante Unterschiede in der CD45RO/RA-Expression zu detektieren wurde in Abb.15 die prozentuale Verteilung der Lymphozyten in den einzelnen Quadranten (Ergebnis der Doppelfluoreszenzanalyse) dargestellt. Dabei wurden die Personen mit dem varianten Expressionsmuster (n=2) den Trägern des normalen Expressionsmusters (n=144) gegenübergestellt.

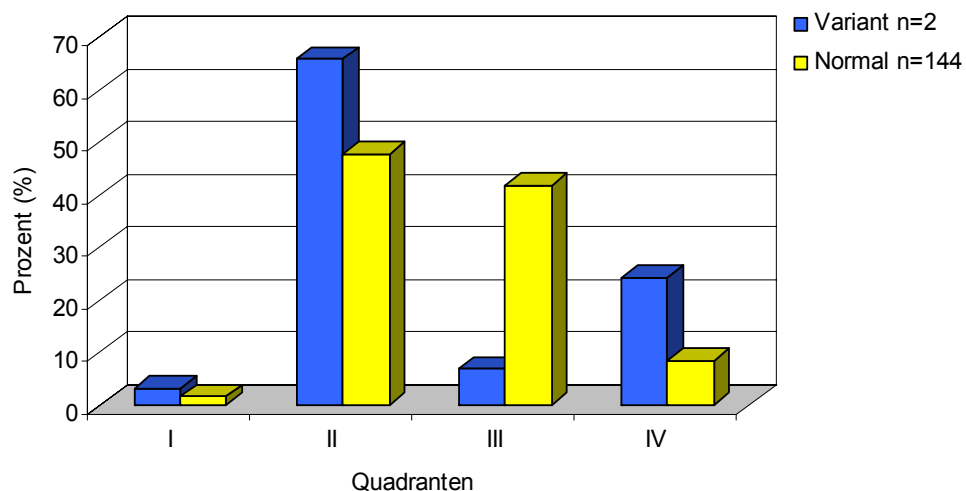


Abb. 15: prozentuale Verteilung der Lymphozyten in den Quadranten der CD45RO/RA-Doppelfluoreszenzanalyse

N = normales -, V = variantes CD45RO/RA-Expressionsmuster

Quadrant I → CD45RO⁰/RA⁰ → 1,69% (N) ; 3,17% (V) p=0,514

Quadrant II → CD45RO⁰/RA⁺ → 47,83% (N) ; 65,85% (V) **p=0,012**

Quadrant III → CD45RO⁺/RA⁰ → 41,86% (N) ; 6,91% (V) **p<0,001**

Quadrant IV → CD45RO⁺/RA⁺ → 8,62% (N) ; 24,21% (V) **p=0,005**

Die Anzahl der doppelt-negativen Zellen war in beiden Kollektiven sehr gering. Sie unterschieden sich mit 1,69% ± 3,77% bei den Trägern des normalen

Expressionsmusters vs. $3,17\% \pm 3,66\%$ bei den zwei Probanden mit dem varianten Muster nicht signifikant voneinander.

Im Gegensatz dazu waren bei den Personen mit dem untersuchten Polymorphismus mit $65,85\% \pm 10,07\%$ signifikant mehr T-Zellen ($p=0,012$) im ruhenden Zustand (Quadrant II) als die Lymphozyten der Wildtypträger, die sich nur zu $47,83\% \pm 9,57\%$ in dieser Region befanden. Die höchste Signifikanz mit $p<0,001$ fand sich im Quadranten III. Während $41,86\% \pm 8,40\%$ der Lymphozyten der 144 Wildtypträger $CD45RO^+/RA^\ominus$ waren, wiesen nur $6,91\% \pm 2,92\%$ der Lymphozyten der zwei Transversionsträger dieses Merkmal auf. Zudem hatten diese Personen mit $24,21\% \pm 10,98\%$ signifikant mehr ($p=0,005$) $CD45RO^+/RA^+$ -Zellen als die Vergleichsprobanden mit $8,62\% \pm 4,78\%$.

Bei der einzelnen Betrachtung von CD45RO und CD45RA zeigten sich eine geringere $CD45RO^+$ -Zellzahl ($31,06\% \pm 13,83\%$ vs. $50,53\% \pm 10,01\%$) ($p=0,022$) und erhöhte Mengen $CD45RA^+$ -Zellen ($90,08\% \pm 0,63\%$ vs. $56,50\% \pm 8,25\%$) ($p<0,001$) bei den Repräsentanten des varianten Musters.

7.7.2 CD45RB- und CD45RC-Expression auf Lymphozyten

Die Untersuchungen auf die CD45RB- und CD45RC-Expression wurden als Einfachfluoreszenzanalysen durchgeführt. Das lymphozytäre CD45RB-Muster unterschied sich mit $95,72\% \pm 3,25$ vs. $95,54\% \pm 4,70\%$ in den Gruppen nicht. Allerdings präsentierten die Punktmutationsträgern mit $71,96\% \pm 7,40\%$ signifikant mehr ($p=0,017$) RC auf Lymphozyten als Personen ohne diese genomische Veränderung ($55,60\% \pm 9,19\%$) (siehe Abb.16).

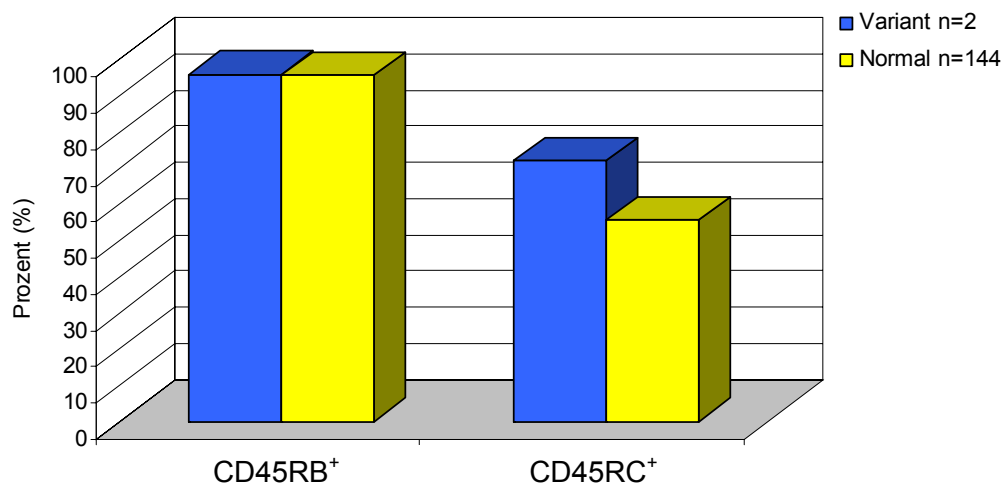


Abb. 16: Prozentuale Verteilung der RB- und RC-Expression auf Lymphozyten

N = normales -, V = variantes CD45RO/RA-Expressionsmuster

CD45RB ⁺	→	95,54% (N) ;	95,72% (V)	p=0,898
CD45RC ⁺	→	55,60% (N) ;	71,96% (V)	p=0,017

7.7.3 CD45RO- und CD45RA-Expression auf Granulozyten

Parallel zur Betrachtung in Punkt 7.7.1 erfolgt nun die Gegenüberstellung der CD45RO/RA-Expression auf Granulozyten von Trägern des varianten Expressionsmusters mit den Individuen, welche das klassische CD45RA-Muster besitzen.

Es ergeben sich mit einem Anteil von $2,62\% \pm 10,61\%$ vs. $2,21\% \pm 2,75\%$ im Quadranten I und mit $2,58\% \pm 10,70\%$ vs. $0,46\% \pm 0,62\%$ im Quadranten II keine signifikanten Unterschiede in der Quantität von CD45RO[○]/RA[○]- und CD45RO[○]/RA⁺-Zellen.

Der Anteil der CD45RO⁺/RA[○]-Granulozyten ist im Quadranten III bei den Trägern des normalen Expressionsmusters mit 89,36% ± 23,01% gegenüber den Zellen bei den Personen mit dem varianten Expressionsmuster statistisch signifikant (p=0,027) erhöht. Nur 62,80% ± 0,63% der Granulozyten waren bei diesen Individuen gleichzeitig RO⁺ und RA[○].

Ein weiterer statistisch nachgewiesener Unterschied (p=0,004) liegt in der erniedrigten Menge doppelpositiver Granulozyten (5,44% ± 9,90%) bei den Personen mit dem normalen Expressionsmuster gegenüber den Probanden mit dem varianten Muster (34,54% ± 4,01%).

Eine grafische Darstellung dieser Fakten ist in Abb.17 zu sehen.

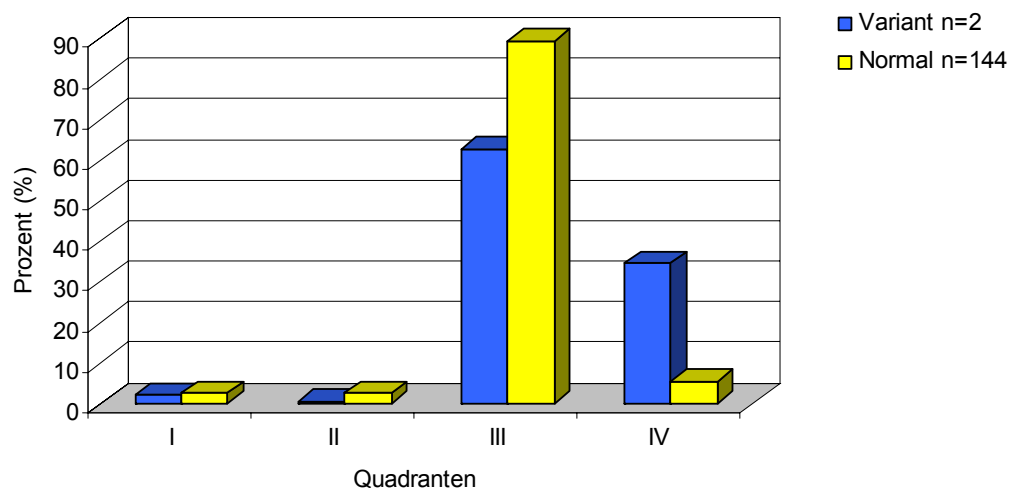


Abb. 17: Prozentuale Verteilung der Granulozyten in den Quadranten der Doppel-fluoreszenzanalyse

N = normales -, V = variantes CD45RO/RA-Expressionsmuster

Quadrant I → CD45RO[○]/RA[○] → 2,62% (N) ; 2,21% (V) p=0,080

Quadrant II → CD45RO[○]/RA⁺ → 2,58% (N) ; 0,46% (V) p=0,378

Quadrant III → CD45RO⁺/RA[○] → 89,36% (N) ; 62,80% (V) **p=0,027**

Quadrant IV → CD45RO⁺/RA⁺ → 5,44% (N) ; 34,54% (V) **p=0,004**

Bei der Einzelbetrachtung von CD45RO und CD45RA konnte ein statistisch ermittelter Unterschied in der Summe aller CD45RA⁺-Zellen erfasst werden. CD45RA⁺-Granulozyten sind signifikant häufiger (p=0,019) bei den Personen des varianten Musters (41,9% ± 2,45%) anzutreffen als bei Individuen mit dem normalen CD45RA-Expressionsmuster (8,31% ± 16,84%).

7.7.4 CD45RB- und CD45RC-Expression auf Granulozyten

Die Expression für CD45RB ($71,46\% \pm 22,27\%$ vs. $67,26\% \pm 11,60\%$) und CD45RC ($1,01\% \pm 1,21\%$ vs. $2,45\% \pm 1,84\%$) auf Granulozyten war zwischen den Personen mit der C77G-Transversion und den Probanden ohne diesen Polymorphismus ähnlich ausgeprägt.

7.8 Vergleich des Patienten- und Kontrollkollektivs unter Ausschluss der Träger des C77G-Polymorphismus

In folgenden Abschnitten werden die HT-Patienten mit dem Kontrollkollektiv bzgl. ihrer CD45R-Expression (RA, RB, RC, RO) verglichen. Dabei werden nur Personen mit einem unauffälligen CD45RA-Expressionsmuster berücksichtigt, welche die Punktmutation an Position 77 im Exon A des CD45-Gens nicht aufwiesen. Folglich wurden 72 Patienten und 72 Kontrollpersonen betrachtet.

7.8.1 CD45RO- und CD45RA-Expression auf Lymphozyten

Beim Vergleich des Patienten- mit dem Kontrollkollektiv fiel auf, dass bei den HT-Patienten mit $44,92\% \pm 8,86\%$ signifikant mehr Lymphozyten ($p < 0,001$) die Eigenschaft $CD45RO^+/RA^\ominus$ besaßen als die Zellen der Vergleichsgruppe, welche nur zu $38,81\% \pm 6,68\%$ dieses Merkmal ausprägten.

Die Summe der $CD45RO^+$ -Zellen zeigte in dieser Zellpopulation die gleiche Tendenz. HT-Patienten wiesen mit $54,84\% \pm 10,28\%$ der Zellen mehr $CD45RO^+$ -Zellen auf, als die Lymphozyten der Kontrollgruppe mit $46,22\% \pm 7,65\%$. Dieser Unterschied wurde durch die statistische Auswertung mit $p < 0,001$ als signifikant erkannt. Dagegen war die Gesamtheit der $CD45RA^+$ -Lymphozyten in der Patientengruppe mit $53,27\% \pm 8,19\%$ im Vergleich zu den gesunden Probanden mit $59,72\% \pm 7,01\%$ bei $p < 0,001$ signifikant erniedrigt.

Eine zusammenfassende Darstellung über die lymphozytäre $CD45RO^+/RA^\ominus$ -, $CD45RO^+$ - und $CD45RA^+$ -Präsentation in den Kollektiven stellt Abb.18 dar.

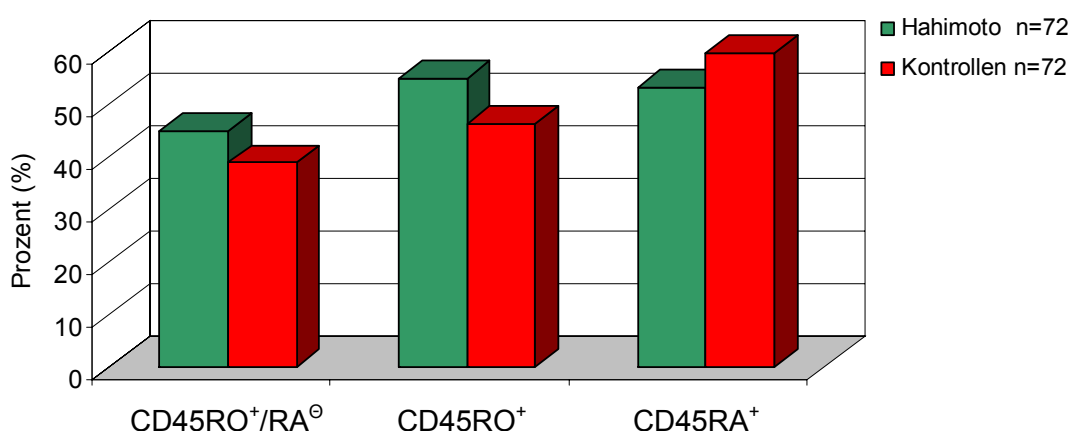


Abb. 18: Prozentuale Verteilung der Merkmale $CD45RO^+/RA^\ominus$, $CD45RO^+$ und $CD45RA^+$ auf Lymphozyten des Patienten- und Kontrollkollektivs

H = Hashimotokollektiv; K = Kontrollkollektiv

$CD45RO^+/RA^\ominus$	→	44,92% (H) ;	38,81% (K)	p<0,001
$CD45RO^+$	→	54,84% (H) ;	46,22% (K)	p<0,001
$CD45RA^+$	→	53,27% (H) ;	59,72% (K)	p<0,001

7.8.2 CD45RB- und CD45RC-Expression auf Lymphozyten

Die Patientengruppe unterschied sich mit $94,92\% \pm 6,27\%$ CD45RB⁺-Lymphozyten nicht signifikant ($p=0,654$) von der Kontrollgruppe, deren Lymphozyten mit $96,15\% \pm 2,11\%$ positiv für dieses Merkmal waren (siehe Abb.19). Anders verhielt es sich mit der CD45RC-Expression. Diese wurde bei $51,95\% \pm 8,61\%$ der Zellen der HT-Patienten und auf $59,24\% \pm 8,31\%$ der Lymphozyten der Kontrollgruppe gefunden (siehe Abb.19). Für dieses Merkmal ergab sich im U-Test eine Signifikanz bei einem p-Wert von $<0,001$.

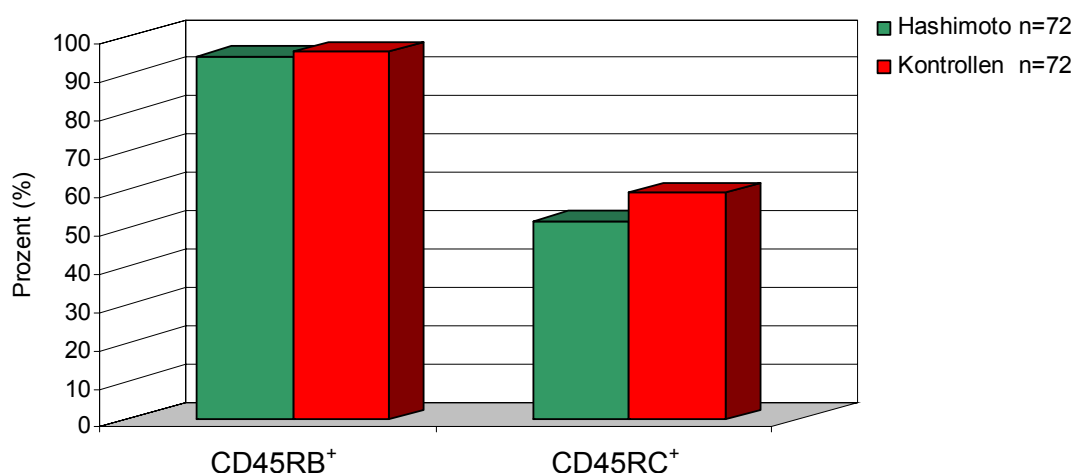


Abb. 19: Prozentuale Verteilung der Merkmale CD45RB⁺ und CD45RC⁺ auf Lymphozyten des Patienten- und Kontrollkollektivs

H = Hashimotokollektiv; K = Kontrollkollektiv

CD45RB ⁺	→	94,92% (H) ;	96,15% (K)	p=0,564
CD45RC ⁺	→	51,95% (H) ;	59,24% (K)	p<0,001

7.8.3 CD45RO- und CD45RA-Expression auf Granulozyten

In der Zellpopulation der Granulozyten fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Trägern des normalen CD45RA-Expressionsmusters des Patienten- und Kontrollkollektiv in Bezug auf die Expression von CD45RO ($91,50\% \pm 24,67\%$ vs. $96,60\% \pm 11,65\%$) und CD45RA ($11,00\% \pm 21,75\%$ vs. $5,61\% \pm 9,14\%$).

7.8.4 CD45RB- und CD45RC-Expression auf Granulozyten

Die Ergebnisse der Untersuchung auf die CD45RB- und CD45RC-Expression auf Granulozyten sind in Abb.20 dargestellt. Es zeigte sich, dass die HT-Patienten mehr CD45RB ($75,49\% \pm 20,03\%$) auf der Zelloberfläche der Neutrophilen präsentierten als die Kontrollprobanden ($67,42\% \pm 23,77\%$). Dieser Unterschied war mit $p=0,048$ statistisch signifikant.

In der Expression des CD45RC unterschieden sich die Kollektive mit $1,03\% \pm 1,06\%$ vs. $0,99\% \pm 1,35\%$ der RC^+ -Zellen nicht.

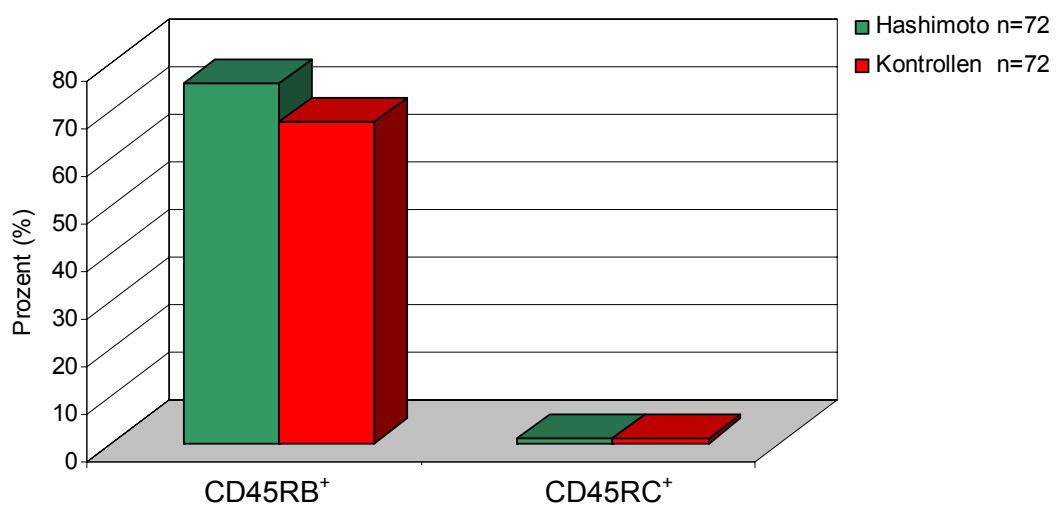


Abb. 20: CD45RB- und CD45RC-Markierung auf Granulozyten des Patienten- und Kontrollkollektivs

H = Hashimotokollektiv; K = Kontrollkollektiv

CD45RB ⁺	→	75,49% (H) ;	67,42% (K)	p=0,048
CD45RC ⁺	→	1,03% (H) ;	0,99% (K)	p=0,383

7.9 Darstellung der Phagozytoseaktivität der Granulozyten

Nachdem Unterschiede in der Expression der, durch Exon A-C kodierten Sequenzen auf Granulozyten in den verschiedenen Kollektiven nachgewiesen werden konnten, soll nun die Phagozytoseaktivität der Granulozyten in den Kollektiven untersucht werden. Dies wurde bei 41 HT-Patienten und 42 Kontrollpersonen durchgeführt. Unter den 42 Vergleichsprobanden befand sich ein Träger des C77G-Polymorphismus, sodass sich dadurch 3 Gruppen bildeten.

1. HT-Patienten	n=41
2. Kontrollpersonen	n=41
3. Träger des C77G-Polymorphismus	n= 1

Da kein statistischer Test für einen Probenumfang von $n=1$ zur Verfügung steht, sind nur statistisch ungesicherte Aussagen in Bezug auf das Individuum mit dem C→G Polymorphismus möglich.

Um möglichst viele Messfehler z.B. durch Bakterienaggregate auszuschließen, wurde zunächst im Histogramm, in welchem die fluoreszierende DNA dargestellt wurde, ein Analysefenster gesetzt. Dieses markierte den DNA-Gehalt einer humanen diploiden Zelle. Anschließend wurde die Granulozytenpopulation im Punktediagramm mit einem Analysefenster markiert (G2), um in einem weiteren DotPlot die Aktivität der Granulozyten grafisch darstellen zu können (siehe Abb.21a-e).

Phagozytotisch aktive Zellen haben die FITC-markierten Bakterien aufgenommen und dementsprechend eine erhöhte Fluoreszenzdichte. Um diese aktiven und somit FITC-markierten Zellen von inaktiven, nicht-FITC-markierten Zellen abzugrenzen, wurde die Fluoreszenzgrenze bei 10 gesetzt (siehe Abb.21a-e).

Pro Proband wurden fünf Proben untersucht, welche durch verschiedene Inkubationszeiten im 37°C warmen Wasser bzw. im Eisgefäß gekennzeichnet waren. Die Probe, welche sich ausschließlich im Eisgefäß aufhielt, diente als Kontrolle.

Je länger der Aufenthalt der Zellen im 37°C warmen Wasser war, desto mehr FITC-markierte Bakterien wurden von den Granulozyten phagozytiert. Daher

nahm die Fluoreszenzintensität zu und die Präsentation der Granulozyten verlagerte sich von Quadrant II in Quadrant IV. Dieses Phänomen ist in Abb.21 dargestellt, wobei sich die fünf Einzelabbildungen auf die jeweilige Aufenthaltsdauer im warmen bzw. kalten Milieu beziehen, welche als Messpunkte dienten. Die verschiedenen Umgebungstemperaturen beeinflussten die Kinetik der Zellen und deren Bestandteile und damit auch die Zellfunktion. Dies wurde durch den Friedman-Test bestätigt, sodass eine Abhängigkeit der Phagozytoseaktivität von der Aufenthaltsdauer im 37°C warmen Wasser festzuhalten ist.

Die Phagozytoseaktivitäten der Granulozyten des Patienten- und Kontrollkollektivs sowie der einen Person mit dem C77G-Polymorphismus sind in Abb.22 dargestellt. Alle Kurven zeigen eine Zunahme der phagozytoseaktiven Granulozytenzahl mit längerer Inkubationszeit im 37°C temperierten Wasser. Zu keinem Zeitpunkt kommt es zu einer Überschneidung der Kurvenverläufe. Der Träger der C77G-Transversion weist zu allen Messpunkten die meisten phagozytoseaktiven Granulozyten auf, während das HT-Kollektiv im Vergleich die wenigsten aktiven Granulozyten besitzt.

Tab.7 und die auf diese Werte beruhende grafische Darstellung (siehe Abb.22) verdeutlichen, dass bereits beim Ausgangspunkt der Messung '10min im Eisgefäß' 8,46% der Granulozyten in der Kontrollgruppe Bakterien phagozytiert haben, während dies nur bei 5,54% der Zellen des Patientenkollektivs der Fall war. Statistische Untersuchungen stellten mit $p=0,001$ einen signifikanten Unterschied fest. Eine solche Differenz war auch nach 1min Inkubationszeit im 37°C temperierten Wasserbad ($p<0,001$) nachweisbar. Bei den bisher genannten Messpunkten ergibt sich auch eine Abweichung gegenüber dem Träger des C77G-Polymorphismus. Die Granulozyten dieser Probe sind zu diesen Zeitpunkten mit 25,54% ('10min im Eisbad') und 72,04% ('1min im 37°C warmen Wasser') aktiver als die Zellen der beiden anderen Kollektive. Dieses Ergebnis wird dadurch gestützt, dass die Menge der phagozytoseaktiven Granulozyten (72,04%) der Person mit der C77G-Transversion beim Messpunkt '1min im 37°C Wasserbad' außerhalb des Streubereiches der beiden anderen Gruppen liegt (Streubereich der Kontrollprobanden: 10,62%-62,04%; Streubereich der HT-Patienten: 3,64%-59,48%). Die Mittelwerte und Streubereiche zu den einzelnen Messpunkten sind in Tab.7 dargestellt.

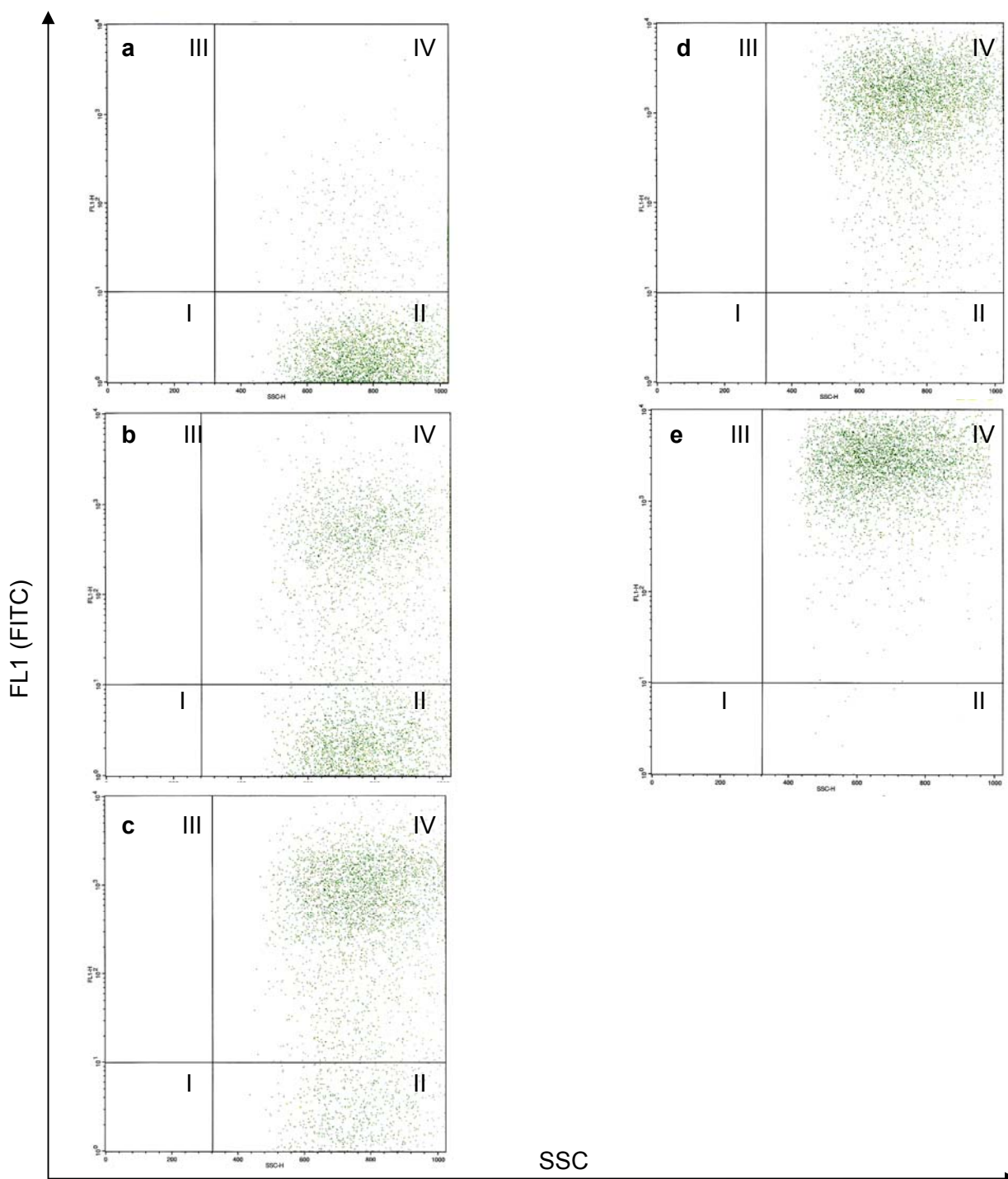


Abb. 21: Exemplarische Darstellung der Phagozytoseaktivität von Granulozyten im Punktediagramm bei normaler CD45RO/RA-Expression

a: Probe – 10min Eiswasser

d: Probe – 5min bei 37°C

b: Probe – 1min bei 37°C

e: Probe – 10min bei 37°C

c: Probe – 2,5min bei 37°C

SSC: Granularität der untersuchten Zellen (G2)

FL1: FITC-Fluoreszenzintensität der von Granulozyten phagozytierten Bakterien

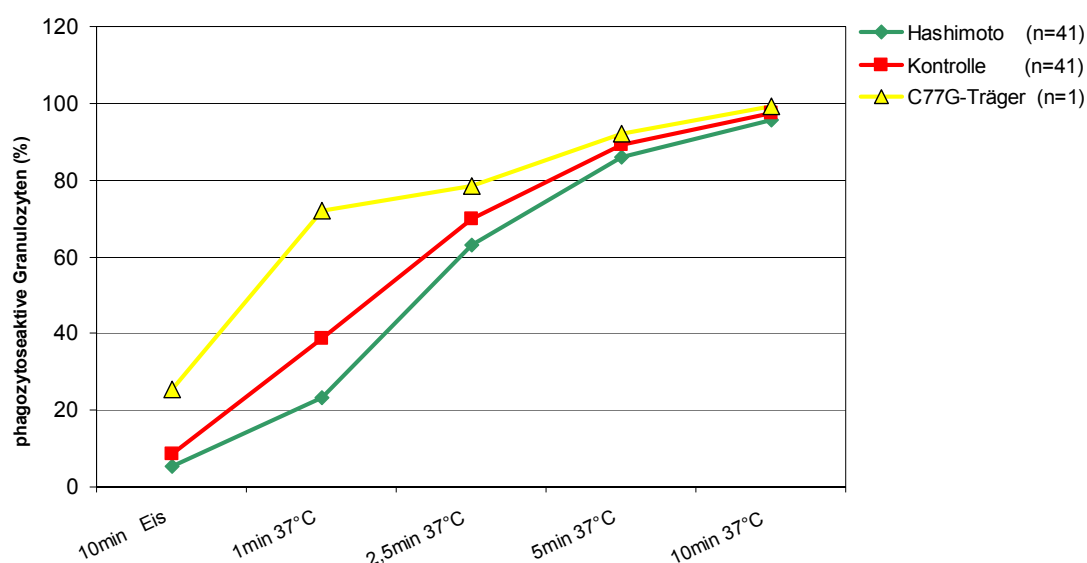


Abb. 22: Prozentualer Anteil der phagozytoseaktiven Granulozyten zu den jeweiligen Messpunkten

x-Achse → Inkubationszeiten der Proben bei verschiedenen Temperaturen

y-Achse → phagozytoseaktive Granulozyten (%)

Die auf der Grafik beruhenden Messwerte sind in Tab.7 dargestellt.

Tab. 7: Mittelwerte und Streubereiche der phagozytoseaktiven Granulozyten

	<i>Patientenkollektiv (n=41)</i>	<i>Kontrollkollektiv (n=41)</i>	<i>C77G-Träger (n=1)</i>
10min Eis	5,54% (0,54% - 18,94%)	8,46% (2,43% - 30,10%)	25,54%
1min 37°C	23,19% (3,64% - 59,48%)	38,86% (10,62% - 62,04%)	72,04%
2,5min 37°C	62,90% (19,68% - 90,47%)	69,97% (48,99% - 84,82%)	78,35%
5min 37°C	86,11% (42,96% - 98,44%)	89,30% (70,45% - 97,88%)	91,98%
10min 37°C	95,77% (69,47% - 99,87%)	97,45% (88,34% - 99,89%)	99,26%

Je länger die Zellen im 37°C warmen Wasserbad inkubierten, desto mehr glich sich die Rate der phagozytoseaktiven Granulozyten in den Gruppen an. Mit $p=0,219$ ('2,5min im 37°C warmen Wasserbad'), $p=0,945$ ('5min im 37°C warmen Wasserbad') und $p=0,550$ ('10min im 37°C warmen Wasserbad') fand sich kein statistisch gesicherter Unterschied zwischen der Kontroll- und Patientengruppe zu den jeweiligen Messzeiten.

Die Zahl der aktiven Granulozyten bei der Person mit dem C77G-Polymorphismus ist beim Messpunkt '2,5min im 37°C warmen Wasser' mit 78,35% im Gegensatz zu den beiden Kollektiven zwar erhöht (69,97% bei den

Kontrollprobanden; 62,90% bei den HT-Patienten), jedoch liegt sie im Streubereich der Vergleichskollektive (Streubereich der Kontrollgruppe: 48,99%-84,82%; Streubereich der HT-Patienten: 19,68%-90,47%). Dieses Verhältnis war auch bei den Messpunkten '5min im 37°C warmen Wasserbad' und '10min im 37°C warmen Wasserbad' zu erkennen. Im Vergleich zu den ersten beiden Messpunkten gleicht sich der Verlauf aller Kurven ab 2,5min Inkubationszeit an, sodass eine finale Annäherung der Phagozytoseaktivitäten aller untersuchten Gruppen zu finden ist.

8 Diskussion

8.1 Allelfrequenz

Das variante CD45RO/RA-Expressionsmuster kam in beiden Kollektiven zu je 1,37% vor. Das variante CD45RO/RA-Expressionsmuster kommt deshalb bei Personen mit HT nicht häufiger oder seltener vor als bei den Kontrollprobanden. Die Verteilung dieses Merkmals in den Kollektiven ist homogen.

Das Resultat für den zu diesem varianten Expressionsmuster zugehörigen C77G-Polymorphismus postuliert eine Allelfrequenz von 0,69% bei HT-Patienten. Im Vergleich mit dem mitgeführten Kontrollkollektiv, bei welchem die Punktmutation im Exon A des CD45-Gens mit der gleichen Häufigkeit vorkam, ist die untersuchte AIK nicht mit dem Polymorphismus assoziiert.

Die Häufigkeit der Punktmutation in der Vergleichspopulation (n=73) passt zu den Ergebnissen anderer europäischer Studien (Tchilian und Beverley 2006), in welchen die Allelfrequenz von 0,0% bei n=303 (Jacobsen et al. 2000) bis 2,0% bei n=197 (Nicholas et al. 2003) schwanken.

Untersuchungen auf die C77G-Transversion wurden bisher nicht bei HT-Patienten durchgeführt, sodass sich diesbezüglich keine Gegenüberstellung zu Ergebnissen anderer HT-Kollektive ergeben. Hingegen wurde eine solche Analyse bei einer anderen AIK der Schilddrüse, dem Morbus Basedow, vorgenommen. Diese Studie hatte das gleiche Resultat wie die vorliegende, da die Patientengruppe mit einer Allelfrequenz von 1,3% keinen Unterschied zur mitgeführten Kontrollgruppe mit einer Frequenz von 1,3% aufwies (Wood et al. 2002). Neben der HT und dem Morbus Basedow wurde noch eine weitere AIK des endokrinen Systems, Diabetes mellitus Typ I, auf den C77G-Polymorphismus untersucht. Diesbezüglich liegen zwei Arbeiten vor. Beide zeigen bei Allelfrequenzen von 0,2% bzw. 1,2% im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollgruppen mit Häufigkeiten von 1,3% bzw. 1,1% keine signifikanten Unterschiede (Thude et al. 2004, Wood et al. 2002). Eine Assoziation zwischen der C→G Transversion und AIK des endokrinen Systems konnte somit noch nicht dokumentiert werden.

Bei anderen Erkrankungen, bei denen eine autoimmune Komponente nachgewiesen wurde oder bislang noch diskutiert wird, konnte in verschiedenen Studien eine erhöhte C77G-Frequenz nachgewiesen werden. Dies ist bei der

Autoimmunhepatitis (Vogel et al. 2003), der systemischen Sklerose (Schwinzer et al. 2003), der Langerhanszellhistiozytose (Boxall et al. 2004a) und der MS (Ballerini et al. 2002, Jacobsen et al. 2000) der Fall. Eine Verbindung des C77G-Polymorphismus zu AIK bleibt umstritten, zumal es Untersuchungen gibt, welche die eben genannten Ergebnisse nicht bestätigen konnten. Hier ist vor allem die Arbeit einer schwedischen Forschungsgruppe zu nennen, welche sich durch einen großen Stichprobenumfang von $n > 1000$ in der Patientengruppe auszeichnet. Es konnte in dieser Studie jedoch keine Signifikanz bzgl. der C→G Transversion bei MS-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe ($n = 630$) ermittelt werden (Vorechovsky et al. 2001). Kleinere Arbeiten von (Barcellos et al. 2001, Milterski et al. 2002) unterstützen diese Feststellung. Weitere Studien, welche den C77G-Polymorphismus in Bezug auf die Autoimmunhepatitis (Esteghamat et al. 2005) und die Rheumatoide Arthritis (Milterski et al. 2004) untersuchten, fanden ebenso keine Assoziation.

Um repräsentative Aussagen in der Beziehung zwischen AIK und dem C77G-Polymorphismus treffen zu können, sind weitere und vor allem umfangreiche Untersuchungen nötig. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie haben diesbezüglich einen vorläufigen Charakter.

Während sich die AIK der Schilddrüse, HT und Morbus Basedow, in Hinsicht auf die C77G-Mutation unauffällig zeigten, verliefen Untersuchungen in Bezug auf die A138G-Punktmutation im Exon C des CD45-Gens erfolgreicher (Boxall et al. 2004b). Die genannte Veränderung soll einen protektiven Schutz vor Autoimmunität und infektiösen Erkrankungen haben, während der C77G-Polymorphismus gehäuft bei AIK und viralen Infekten, wie HIV (Tchilian et al. 2001b) und HCV (Dawes et al. 2006b) auftreten soll (Boxall et al. 2004b, Dawes et al. 2006a, Dawes et al. 2006b, Stanton et al. 2003). Sowohl die HT als auch der Morbus Basedow zeigten gegenüber den Kontrollgruppen deutlich reduzierte Frequenzen im Vorkommen der A138G-Transversion, wobei nur das Resultat des Morbus Basedow dem Signifikanztest Stand hielt (Boxall et al. 2004b).

Neben dem isolierten Auftreten des A138G-Polymorphismus ist es durchaus denkbar, dass auch die Kombination aus einer verminderten Protektion (A138G) und einer erhöhten Anfälligkeit (C77G) für Autoimmunität einen Beitrag

zur Pathogenese der HT leistet. Untersuchungen zu dieser Möglichkeit sind bisher noch nicht publiziert. Um dieser Fragestellung weiter nachzugehen, müssten möglichst große Kollektive auf beide Mutationen getestet und auch die Funktion der, durch Exone A und C kodierten Sequenzen genauer eruiert werden.

Da AIK nicht nur multiätiologisch sondern auch multigenetisch bedingt sind, wird das CD45-Gen als ein Modifier-Gen in der Entstehung solcher Erkrankungen diskutiert. Die hier gefundenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass das CD45-Molekül in der Ätiologie für die HT von geringer Bedeutung ist. Dennoch muss bedacht werden, dass die C77G-Transversion populationsabhängig ist. So wurde sie in der afrikanischen Bevölkerung noch gar nicht beschrieben, während sie in Regionen Zentralasiens gehäuft vorkommt (Tchilian et al. 2002). Die hier erzielten Ergebnisse sind regional auf den (mittel-)deutschen Raum beschränkt, sodass eine Übertragung auf andere Gebiete nur sehr bedingt möglich ist.

Ein weiteres Ergebnis der vorliegenden Arbeit besteht im Vorkommen von ausschließlich heterozygoten Mutationsträgern. Grund dafür können die niedrigen Stichprobenumfänge sein, da die Frequenz des C77G-Polymorphismus sehr gering ist. Laut Hardy-Weinberg-Gesetz müssten bei der gefundenen Frequenz heterozygoter Merkmalsträger von 1,37% etwa 21.316 Probanden untersucht werden, um eine homozygote Person zu finden. Des Weiteren kann die bekannte Beteiligung des CD45-Moleküls an der Reifung der Lymphozyten (Trowbridge und Thomas 1994) für dieses Phänomen ausschlaggebend sein, denn ein homozygoter Zustand könnte zu einem Fehler in der Ausreifung von Lymphozyten und damit zu schweren Immundefekten führen. Die Lebenserwartung wäre stark eingeschränkt. Diese Hypothese wird durch zwei Berichte (Kung et al. 2000, Tchilian et al. 2001a) unterstützt, welche je einen Patienten mit reduzierter bzw. fehlender CD45-Expression vorstellen.

In der einen Publikation (Tchilian et al. 2001a) wird von einer 6bp langen Deletion im Exon 11 des CD45-Gens berichtet, welche eine Veränderung im Fibronektin III der extrazellulären Domäne des CD45-Moleküls hervorruft. Diese Modifikation führte zu einer stark verminderten CD45-Expression und trat

zusammen mit dem Krankheitsbild SCID auf. Der Patient verstarb nach einer erfolglosen Knochenmarkstransplantation.

In einem anderen Fall wurde bei einem Patienten eine große Deletion im CD45-Gen auf einem Chromosom festgestellt, während das Gen auf dem verbleibenden Chromosom eine Punktmutation im Exon 13 aufwies. Bei der betroffenen Person konnte keine CD45-Expression auf den Lymphozyten ermittelt werden. Auch hier lag ein schweres Immundefizit vor (Kung et al. 2000).

Die geschilderten Fälle unterstreichen die Beteiligung des CD45-Moleküls an Immunprozessen und liefern eine Begründung für das Fehlen homozygoter Merkmalsträger.

8.2 Diskussion der Ergebnisse zwischen Personen mit varianten und normalen CD45RA-Expressionsmustern

8.2.1 CD45R-Expression auf Lymphozyten

Die C77G-Punktmutation wurde bei insgesamt zwei Probanden gefunden, welche sich durch eine deutlich verminderte $CD45RO^+/RA^{\ominus}$ -Lymphozytenzahl auszeichneten. Memory-T-Zellen, welche normalerweise dieses Muster aufweisen, exprimieren bei diesen Individuen auf Grund des fehlerhaften Spleißvorgangs zusätzlich CD45RA, sodass sie als $CD45RO^+/RA^+$ gekennzeichnet sind. Dies erklärt das vermehrte Vorkommen $CD45RO^+/RA^+$ -Zellen bei den Trägern des Polymorphismus.

Des Weiteren charakterisieren sich die varianten Merkmalsträger durch eine verminderte $CD45RO^+$ -Zellzahl und eine erhöhte $CD45RA^+$ -Zellzahl gegenüber den Personen mit dem normalen CD45-Expressionsmuster. Die $CD45RA^+$ - und $CD45RO^+$ -Zellen haben ein unterschiedliches Verhalten bezüglich der TZR-assoziierten Signalantwort (Hall et al. 1999). Ursächlich ist eine gesteigerte Phosphorylierung verschiedener Protein-Tyrosin-Kinasen ($p56^{lck}$, Zap70) beim varianten CD45-Muster. Durch eine sich daran anschließende Signaltransduktion wird die Synthese verschiedener Interleukine (IL-2, IL-4, IL-10) verstärkt. Weiterhin kommt es durch die Induktion eines veränderten Phosphorylierungsmusters des TZR zur Herabsetzung der Aktivierungsschwelle

der zugehörigen T-Zelle (Do et al. 2005, Do et al. 2006, Hall et al. 1999). Ebenso führt die reduzierte Homodimerisierungsrate höhermolekularer Isoformen, welche durch die verstärkte CD45RA-Expression bei C77G-Trägern vermehrt zu finden sind, zu einer geringer ausgeprägten Inhibition der Aktivität des TZR (Xu und Weiss 2002). Durch die eben geschilderten Einflüsse des C77G-Polymorphismus auf den TZR und entsprechend auf die T-Zelle kann eine überschießende Immunantwort ausgelöst werden. AIK können die Folge sein, sodass eine Assoziation zwischen der C→G Transversion und AIK logisch erscheint – in dieser Studie aber nicht nachgewiesen werden konnte.

Es ist bekannt, dass Lymphozyten sowohl im naiven als auch im aktivierten Zustand CD45RB exprimieren (Rogers et al. 1992, Thomas 1989). Da keine markanten Veränderungen dieser Expression zwischen den C77G-Trägern und den Personen mit der Wildtypsequenz auftraten, hatte der Polymorphismus keinen Einfluss auf die Expression der durch Exon B kodierten Sequenz.

In einer vergleichbaren Analyse bei Patienten mit MS (Jacobsen et al. 2000) unterschieden sich die Personen (n=6) mit einem varianten CD45R-Expressionsmuster durch eine erhöhte Expression von CD45RB signifikant von den Kontrollpersonen (n=7). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden, da die gefundenen zwei Probanden mit dem varianten Muster keine Unterschiede in der Quantität von CD45RB im Vergleich zu den restlichen Personen mit normalem Expressionsmuster aufwiesen. Zur Bestätigung bzw. Widerlegung der Feststellung, die Jacobsen et al. (2000) traf, sind mehr als die hier entdeckten zwei Probanden mit dem C77G-Polymorphismus nötig.

CD45RB markiert sowohl naive als auch Memory-T-Zellen. Da CD45RB durch verschiedene Kombinationen mit Exon A und C kodierenden Sequenzen auftreten kann, existieren Unterschiede in den MW der vier CD45RB⁺-Isoformen [ABC (220kDa), AB (210kDa), BC (210kDa), B (190kDa)]. All diese Formen werden auf ruhenden/naiven T-Zellen präsentiert. Nach Zellaktivierung bleibt nur noch die niedermolekulare Isoform B erhalten, welche neben der für Memory-T-Zellen typischen Isoform O exprimiert wird (siehe Abb.2).

Die Träger des C77G-Polymorphismus wiesen in dieser Arbeit im Bereich der aktivierten Lymphozyten eine verminderte Expression der Isoform O und ein

erhöhtes Vorkommen der von Exon A kodierten Sequenz auf. CD45RA wird in der Isoform AB exprimiert (siehe Abb.2). Dies würde trotz gleich bleibender CD45RB-Expression eine Veränderung des MW der CD45RB-haltigen Isoformen bedeuten [AB (210kDa), B (190kDa)].

Das MW der CD45RB-Formen stellt deshalb ein Unterscheidungsmerkmal für naive (hochmolekulare RB-Formen) und aktive T-Zellen (niedermolekulare RB-Formen) dar. Aufgrund dieser Eigenschaft ist es nachzuvollziehen, dass Zellen mit einer hochmolekularen RB-Form ein anderes Zytokinmuster (vermehrt IL-10 und IL-4, verminderte Menge von TNF- α) freisetzen als Zellen mit niedermolekularen CD45RB (Ten Hove et al. 2004). Ob zwischen dem Protein des Exon B und der beobachteten Zelleigenschaft der veränderten Zytokinzusammensetzung ein kausaler Zusammenhang auftritt oder ob dies der Funktion anderer CD45R-Formen entspricht, ist gegenwärtig ein Forschungsschwerpunkt, welcher u.a. durch die Gruppe um Ten Hove (Ten Hove et al. 2004) bearbeitet wird. Sie untersuchte die Beziehung zwischen CD45RB und der Zytokinausschüttung bei den inflammatorischen Darmerkrankungen Kolitis ulcerosa und dem Morbus Chron. Die Arbeitsgruppe kam zu dem Schluss, dass das Zytokinmuster mit dem Level der RB-Expression, unabhängig von der RO- und RA-Expression, korreliert. Ein weiterer interessanter Aspekt in der Studie ist die Beobachtung, dass der Transfer von hochmolekularen RB-Formen in immungeschwächten Tieren entzündliche Darmerkrankungen hervorruft, während die Übertragung von niedermolekularen CD45RB-Zellen den Eintritt dieser Erkrankungen verzögert bzw. verhindert. Verantwortlich dafür könnte eine erhöhte proinflammatorische und erniedrigte antiinflammatorische Zytokinfreisetzung der Zellen mit hochmolekularen RB-Formen gegenüber denen mit der niedermolekularen Isoform sein. Vermutet wird deshalb eine Rolle des RB in der Pathogenese der entzündlichen Darmerkrankungen, bei welchen autoimmunologische Bausteine in der Ätiologie diskutiert werden.

Den obigen Ausführungen entsprechend ist auch eine Beteiligung des CD45RB mit dem zugehörigen Zytokinmuster in der Ätiologie und Pathogenese der HT denkbar. Um diese Vermutung zu bestätigen bzw. zu widerlegen sind weitere Untersuchungen zur Funktion und Quantität der CD45RB-Expression sowie zur Expression CD45RB-haltiger Isoformen bei HT nötig.

Während die Punktmutation nicht mit Veränderungen der CD45RB-Expression assoziiert war, trifft dies für die CD45RC-Expression zu, da die Träger der C77G-Transversion im Vergleich zu den Personen mit dem klassischen CD45-Muster eine signifikant erhöhte CD45RC⁺-Lymphozytenzahl aufwiesen. Dieses Resultat wird durch eine deutsche Arbeitsgruppe unterstützt, welche die gleiche Beobachtung bei ihrer Untersuchung auf einen Zusammenhang des C77G-Polymorphismus mit MS (Jacobsen et al. 2000) machte.

Lymphozyten haben je nach ihrem CD45RC-Besatz ein anderes Zytokinmuster (Subra et al. 2001, Xystrakis et al. 2004). Zellen mit einem hohen Level an CD45RC binden vermehrt den CD45RC-AK. Sie weisen eine hohe Fluoreszenzdichte auf und werden dementsprechend als CD45RC^{high} bezeichnet. Diese Zellen sezernieren vergleichsweise viel IL-2 und IFN- γ . IL-2 stimuliert das Wachstum von T- und B-Zellen, welche bereits durch AG stimuliert wurden. IFN- γ aktiviert zytotoxische T-Zellen (Volpé 1994). Seine Beteiligung wird in der Pathogenese der HT diskutiert (Ito et al. 2006).

In dieser Studie wurde lediglich die Zahl der CD45RC⁺-Zellen ermittelt, jedoch keine Unterscheidung bzgl. der Fluoreszenzdichte dieser Zellen vorgenommen. Deshalb kann kein Bezug auf einen eventuell vorhandenen Zusammenhang zwischen CD45RC^{high}-Zellen und der HT hergestellt werden. Eine Assoziation zwischen diesen Komponenten ist aber denkbar, da ein erhöhtes Vorkommen von IL-2 und IFN- γ , sezerniert von CD45RC^{high}-Zellen, auf Grundlage ihrer Funktionen die Zahl autoaggressiver Zellen im Organismus erhöhen und somit zur Induktion und Aufrechterhaltung autoimmuner Prozesse beitragen könnten.

8.2.2 CD45R-Expression auf Granulozyten

Die Granulozytenpopulation, welche größtenteils aus Neutrophilen besteht, verhält sich in Bezug auf das Oberflächen-AG CD45 anders als die bisher betrachteten Lymphozyten. Im Gegensatz zu diesen exprimieren Neutrophile im nichtstimulierten Zustand das niedermolekulare CD45RO (Caldwell et al. 1991b). CD45RA ist in diesem Zellstatus kaum an der Oberfläche, sondern in einem intrazellulären Pool zu finden (Caldwell et al. 1991a), sodass nur 3-15% der neutrophilen Granulozyten CD45RA⁺ sind (Caldwell et al. 1991b).

CD45RA wird besonders während des Reifungsprozesses der Granulozyten auf der Zelloberfläche beobachtet. Seine Expression sinkt mit zunehmender Präsentation der Isoform O, welche im Blasten bzw. Promyelozytenstadium auftritt und mit zunehmender Zellreife vermehrt in die Zellmembran eingebaut wird (Caldwell et al. 1991b, Jensen et al. 1989).

Nach Stimulation der Granulozyten (z.B. durch bakterielle Infekte) beobachtet man eine erhöhte CD45RA-Expression auf diesen Zellen (Caldwell et al. 1991a, Patterson et al. 1993). Die Aktivierung der Granulozyten verläuft mit einem Kalziumeinstrom. Dadurch wird die Verschmelzung der intrazellulären Granula mit der Zellmembran induziert und CD45RA präsentiert. Auch ein gesteigertes Auftreten der Vorläuferzellen, z.B. im Rahmen einer akuten myeloischen Leukämie (Miyachi et al. 1999) führt zu einem vermehrten Nachweis von CD45RA auf Granulozyten.

Der C77G-Polymorphismus führt bei den beiden gefundenen Mutationsträgern zu einem veränderten Expressionsmuster. Die eingeschränkte Synthese der Isoform O durch die gestörte Elimination des Exon A vor der Translation kann die Reduktion der $CD45RO^+/RA^0$ -Fraktion in der Durchflusszytometrie sowie die vermehrte Expression von CD45RA erklären. Diese Ergebnisse werden von der Arbeitsgruppe um Schwinzer et al. (1992) unterstützt. Sie berichtete bei C77G-Trägern über das vermehrte Vorkommen von $CD45RA^+$ Granulozyten.

Weder das Vorhandensein einer Infektion, noch das erhöhte Vorkommen von Vorläuferzellen der myeloischen Reihe wurde durch entsprechende Maßnahmen vor der Blutentnahme bei den HT-Patienten ausgeschlossen, sodass diese zwei Ereignisse 'Differentialdiagnosen' zur CD45RA-Expression auf Granulozyten darstellen.

Welche Auswirkung diese Veränderung auf die Funktion der Granulozyten hat, bleibt noch zu erforschen. Zwar gibt es Hinweise auf eine Beeinflussung der Protein-Tyrosin-Kinase p56lck durch CD45RO und -RA (Yu et al. 2002), jedoch liegen die genauen Vorgänge noch im Dunkeln.

Ein Einfluss von CD45 auf die Phagozytose konnte durch entsprechende AK (CD45RO-AK, CD45RA-AK) bereits beobachtet (Yu et al. 2002). Um diesem Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen CD45 und Phagozytose nachzugehen, ist es sinnvoll die Interaktionen der einzelnen Isoformen in Hinsicht auf die Granulozytenfunktion zu untersuchen. Vielleicht wird dadurch

ein modulierbarer Mechanismus gefunden, um positiv auf die Zellen im Zusammenhang mit pathologischen Ereignissen zu wirken.

Untersuchungen zu der Expression und Funktion des CD45RB auf Neutrophilen sind sehr rar. Die meisten Beobachtungen diesbezüglich wurden bei eosinophilen Granulozyten vorgenommen. Die Ergebnisse der vorliegenden Analyse sowie die Betrachtung bei Eosinophilen (Matsumoto et al. 1998) lassen vermuten, dass eine CD45RB-Expression auf Granulozyten physiologisch ist.

Weitere Studien beschäftigten sich mit der funktionellen Komponente von CD45RB in der Granulozytenpopulation. Die Phagozytosefunktion der Neutrophilen wurde im Zusammenhang mit der, durch Exon B kodierten Sequenz noch nicht untersucht. Allerdings können einige Aussagen über eosinophile und basophile Granulozyten getroffen werden. So wurde nach Zugabe von CD45RB-AK eine Reduktion des CD62L auf der Zelloberfläche der eosinophilen Granulozyten beobachtet (Matsumoto et al. 1998). Diese Veränderung soll eine Rolle bei der Diapedese sowohl der eosinophilen als auch der neutrophilen Zellen spielen (Neeley et al. 1993, Knol et al. 1994). Letzteres widerspricht allerdings der Beobachtung einer Arbeitsgruppe, welche die genannte CD62L-Reduktion nicht bei neutrophilen Granulozyten beobachtete (Stibenz et al. 1996). Weiterhin konnte ein verstärktes Auftreten von CD11b nach Hinzufügen des RB-mAK identifiziert werden (Matsumoto et al. 1998). Weiterhin soll CD45RB eine entscheidende Bedeutung bei der Degranulation von Eosinophilen zukommen (Horie und Kita 1994). Auch bei basophilen Granulozyten konnte durch Zugabe von anti-CD45-AK die Degranulation erreicht werden (Hook et al. 1991).

Die Granulozyten präsentierten nur einen sehr geringen Anteil CD45RC⁺-Zellen. Dieser kann vernachlässigt werden, zumal Messfehler jedes Ergebnis in geringem Maße verfälschen. Eine fehlende Reaktion der Granulozyten mit dem CD45RC-AK wurde auch durch eine weitere Arbeitsgruppe (Zapata et al. 1994) bestätigt. Dies lässt vermuten, dass CD45RC auf dieser Zellgruppe nicht exprimiert wird. Somit ist eine Bedeutung des CD45RC für die Granulozytenfunktion eher unwahrscheinlich.

8.3 Diskussion der Ergebnisse zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv unter Ausschluss der Träger des C77G-Polymorphismus

8.3.1 CD45R-Expression auf Lymphozyten

Bei der Gegenüberstellung der Wildtypträger, je nach ihrer Zugehörigkeit zum Patienten- bzw. Vergleichskollektiv, fällt auf, dass die HT-Patienten signifikant weniger CD45RA, dafür aber vermehrt CD45RO auf den T-Lymphozyten exprimieren. Die Fraktion der aktivierten T-Zellen ($CD45RO^+/RA^{\ominus}$) war deshalb größer als in der Kontrollgruppe. Dieses Phänomen ist durch die chronische Entzündungskomponente in der HT zu erklären. Das Immunsystem versucht das provozierende AG zu beseitigen. Auto-AG, wie die Thyreoperoxidase (TPO) oder das Thyreoglobulin (Tg) werden aber vom Organ nachgebildet. Eine vollständige Elimination dieser AG ist deshalb nicht möglich, die Immunreaktion wird dadurch ständig provoziert.

Die CD45RB-Expression auf Lymphozyten war auch im Vergleich der HT-Gruppe mit den Kontrollprobanden unauffällig. Da festgestellt wurde, dass vermehrt aktive T-Zellen bei den HT-Patienten zu finden sind, müssten diese Probanden auch vermehrt niedermolekulares CD45RB aufweisen (siehe Abb.2). Da aber die MW bzw. die exprimierten Isoformen nicht untersucht wurden, bleibt dies nur eine Schlussfolgerung aus den bisher bekannten Fakten.

Zellen mit hochmolekularem CD45RB produzieren im Vergleich zu aktiven Zellen (niedermolekulare CD45RB-Formen) weniger antiinflammatorische Zytokine und vermehrt $TNF-\alpha$ (Ten Hove et al. 2004). Dies steht im Widerspruch zu dem vermehrten Auftreten aktivierter Lymphozyten, welche niedermolekulares CD45RB präsentieren, bei HT-Patienten. Bei diesen Personen konnten erhöhte Mengen von $TNF-\alpha$ nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde eine Korrelation eines erhöhten $TNF-\alpha$ -Spiegels mit dem vermehrten Vorkommen von $IFN-\gamma$ beobachtet. Beide Zytokine wurden besonders bei HT-Patienten mit einem hohen TPO-AK-Titer gefunden. Die Arbeitsgruppe, die diese Ergebnisse gewann, stellte die Hypothese auf, dass erhöhte Werte des TPO-AK mit einer verstärkten Produktion zytotoxizitätsfördernder Zytokine, wie $TNF-\alpha$ und $IFN-\gamma$, korrelieren und dies für eine hohe Krankheitsaktivität spricht (Karanikas et al. 2005).

Durch den C77G-Polymorphismus wird höhermolekulareres CD45RB in Form der Isoform AB exprimiert und kann nach der oben ausgeführten Sachlage zu einer erhöhten Ausschüttung von TNF- α führen. Ein Nachweis der C \rightarrow G Transversion bei den, von Ten Hove et al. (2004) untersuchten, HT-Patienten mit den hohen TPO-AK-Titern und der vermehrten Produktion von TNF- α und IFN- γ wäre denkbar. Da aber ein Zusammenhang zwischen der Punktveränderung im Exon A des CD45-Gens und der HT noch nicht hergestellt werden konnte, erscheint diese Möglichkeit als unwahrscheinlich. Um definitiv klären zu können ob ein Zusammenhang zwischen der HT und den CD45RB-Formen unterschiedlicher MW existiert und in welcher Beziehung die genannten Zytokine dazu stehen, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Neben der Unauffälligen CD45RB-Expression im Patientenkollektiv waren weniger Lymphozyten mit dem CD45RC-AK markierbar. Da naive T-Zellen CD45RC⁺ (siehe Abb.2) sind und dieses Merkmal nach der Aktivierung verloren geht, ist dies ein Hinweis auf das vermehrte Vorkommen aktivierter T-Zellen bei HT-Patienten. Tierexperimentelle Untersuchungen ergaben, dass T-Zellen je nach Intensität der AK-Fluoreszenz in CD45RC^{high}- (Zellen mit hoher Fluoreszenzdichte) und CD45RC^{low}-Zellen (Zellen mit geringer Fluoreszenzdichte) eingeteilt werden. Diese so eingeteilten Zellgruppen sezernieren verschiedene Zytokinmuster. Eine Prädisposition zu verschiedenen AIK ergibt sich beim Überwiegen einer Zellgruppe (Subra et al. 2001, Xystrakis et al. 2004). Da in dieser Studie nur die Zahl der CD45RC⁺-Zellen gemessen, nicht aber die Fluoreszenzintensität ausgewertet wurde, sind keine Aussagen über eine Assoziation von CD45RC^{high}-/CD45RC^{low}-Zellen zur HT möglich.

8.3.2 CD45R-Expression auf Granulozyten

Da sich in der Untersuchung dieser Zellpopulation keine Unterschiede in der CD45RO/RA-Expression fanden, kann davon ausgegangen werden, dass beide Kollektive etwa die gleiche Menge aktivierter Granulozyten aufweisen.

Bakterielle Infektionen, welche durch Zellaktivierung zu einer erhöhten CD45RA-Expression auf Granulozyten beitragen, spielen bei der Induktion der HT eine Rolle. Ein gehäuftes Auftreten von bakteriellen Erkrankungen wurde aber bei HT-Patienten noch nicht beschrieben (Tomer und Davies 1993),

sodass die Granulozyten in der Patientengruppe den gleichen Aktivitätszustand haben dürften wie in der Kontrollgruppe.

Im Gegensatz zu der CD45RO/RA-Expression exprimierte das Patientenkollektiv vermehrt CD45RB auf den Granulozyten. Da weitere Untersuchungen in diesem Bereich fehlen (siehe Punkt 8.2.2) sind keine definitiven Aussagen möglich. Eine Beeinflussung von Zellfunktionen, wie der Diapedese, wird diskutiert. Inwiefern Korrelationen der erhöhten Anzahl CD45RB⁺-Granulozyten in der HT-Gruppe und der Phagozytoseaktivität bestehen, wird bei den Ergebnissen des Granulozytenfunktionstests diskutiert.

Parallel zu Punkt 8.2.2 wiesen die Granulozyten nur sehr geringe Mengen CD45RC auf, welche durch Messungenauigkeiten erklärt werden können. CD45RC kommt vermutlich nicht auf Granulozyten vor (Zapata et al. 1994), sodass ein Einfluss des CD45RC auf die Funktion dieser Zellen unwahrscheinlich wird.

8.4 Granulozytenfunktionstest

Die Überprüfung der Phagozytoseaktivität wurde nur bei einem Teil der auf das CD45R-Expressionsmuster geprüften Probanden durchgeführt. Die Unterteilung in Personen mit variantem Expressionsmuster und die Einteilung der übrigen Probanden in das Patienten- bzw. Kontrollkollektiv ergab ein interessantes Ergebnis.

Zunächst konnte in allen Gruppen festgestellt werden, dass sich die Kinetik der Zellen mit längerer Inkubationszeit im 37°C warmen Wasserbad signifikant steigerte. Dieses Ergebnis ist nicht verwunderlich, da Wärme die Stoffwechselprozesse der Zellen fördert und somit auch ihre Aktivität.

Die Ausgangsaktivität (Messpunkt: '10min Eisbad') der Granulozyten war beim einzigen C77G-Träger im Vergleich zu den Personen mit unverändertem CD45RA-Expressionsmuster erhöht. Zudem fiel auf, dass die Zellen des varianten Trägers bei bereits kurzer Aufenthaltsdauer von '1min im 37°C warmen Wasser' eine drastische Erhöhung der Phagozytoseaktivität zu

verzeichnen hatten. Mit zunehmender Erwärmungsdauer passte sich das Aktivitätsniveau der Granulozyten den Zellen der beiden anderen Kollektive an. An den beiden Messpunkten, '10min. Eisbad' und '1min. 37°C-Wasser', besteht ein statistisch gesicherter Unterschied zwischen der HT- und der Kontrollgruppe, wobei die Zellen des Kontrollkollektivs aktiver waren als die der HT-Gruppe.

Die Phagozytoseaktivität könnte durch die unterschiedliche Expression von Exon A-B kodierenden Sequenzen sowie CD45RO auf Granulozyten beeinflusst werden, da sich diesbezüglich Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen fanden. Diese Differenzen lagen zwischen den HT-Patienten und Kontrollprobanden in der vermehrten CD45RB-Expression der Patientengruppe. Unterschiede waren auch im Vergleich der Wildtypträger mit den Personen, welche die C77G-Transversion hatten, zu erkennen. Die Träger des varianten CD45RA-Expressionsmusters wiesen im Vergleich zu den Probanden mit dem klassischen CD45RA-Muster eine verringerte CD45RO⁺/RA⁰-Zellzahl sowie eine erhöhte Menge CD45RA⁺- und doppelpositiver CD45RO⁺/RA⁺-Zellen auf.

Die Arbeitsgruppe um Szabo et al. (1996) stellte Veränderungen in den Neutrophilen bei verschiedenen Schilddrüsenerkrankungen fest. So wurde u.a. bei der HT Veränderungen im Leukotrienmuster und in intrazellulären Prozessen beschrieben. CD45-Isoformen können bei Interaktionen mit Leukotrienen die chemotaktische Antwort von neutrophilen Zellen verbessern (Liles et al. 1995). Neben dieser Funktion der polymorphnukleären Zellen kann auch die zelluläre Zytotoxizität (ADCC), Zytokinproduktion (Gao et al. 2000) und die Phagozytoseaktivität durch CD45 beeinflusst werden (Yu et al. 2002), was Untersuchungen mit CD45-AK zeigten. Yu et al. (2002) untersuchte die Phagozytoseeigenschaft mit Hilfe von AK, welche gegen CD45, CD45RA und CD45RO gerichtet waren. Es zeigte sich eine Steigerung der Phagozytose, vor allem durch Steigerung der Expression bestimmter Rezeptoren, wie CR3 und CD11b. Letzterer wurde bereits mit der Degranulation von Eosinophilen in Zusammenhang gebracht (Matsumoto et al. 1998) und könnte auch bei der Funktionswahrnehmung der Neutrophilen eine wichtige Rolle spielen.

Der Einfluss des CD45 auf die Phagozytoseaktivität wird durch den Unterschied des varianten Trägers zu der Patienten- und Kontrollgruppe verdeutlicht. Der

Träger stammt ursprünglich aus der Gruppe der Kontrollpersonen. Wäre CD45 ohne Einwirkung auf die Phagozytose, müsste die Aktivität des C77G-Trägers mit den Kontrollprobanden vergleichbar sein, welches aber nicht zutrifft. Dies weist auf einen Einfluss von CD45RA hin. Der Mutationsträger exprimierte vermehrt CD45RA auf den Granulozyten, welches ein Marker für aktive Granulozyten darstellt. Die Differenz in der CD45RA-Expression kann deshalb die unterschiedliche Ausgangsaktivität der Zellen in den verschiedenen Gruppen begründen, wenn man davon ausgeht, dass die Interaktionen der CD45-Isoformen mit anderen Rezeptoren für diese Funktion mitentscheidend sind, wie die Ergebnisse von Yu et al. (2002) vermuten lassen.

Aber auch andere Faktoren und Isoformen scheinen beteiligt zu sein, da zwischen Granulozyten der HT- und Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied im CD45RO- und RA- Muster zu finden war. In diesem Fall könnte das CD45RB eine Rolle spielen, da es in diesen Gruppen unterschiedlich stark exprimiert wurde und ihm bereits eine Bedeutung in der Diapedese und Chemotaxis bei Eosinophilen, Basophilen und Neutrophilen nachgesagt wird (Neeley et al. 1993, Knol et al. 1994). Eine Veränderung der Phagozytose-tätigkeit bei Neutrophilen durch CD45RB ist daher denkbar. Sie wurde bisher aber nicht untersucht bzw. publiziert. Die durch Exon B kodierte Sequenz wurde vermehrt bei HT-Patienten gefunden, welche eine verringerte Anfangsaktivität *in vitro* aufwiesen. Aus diesem Grund kann die Inhibition der Phagozytoseaktivität durch ein vermehrtes Auftreten von CD45RB vermutet werden.

Die Untersuchung der Phagozytoseaktivität wurde *in vitro* durchgeführt. Die Zellen verweilten 10min im Eisbad und inkubierten anschließend unterschiedlich lange im körperwarmen Milieu. Diese Umstände treten im Organismus nicht auf, da eine recht kontinuierliche Temperatur von 36-37°C herrscht. Dieser Temperaturbereich wurde bei längerer Aufenthaltsdauer der Blutproben im 37°C warmen Wasser erreicht. Die Phagozytoseaktivität glich sich zu diesem Zeitpunkt in allen untersuchten Gruppen an, sodass kein statistischer Unterschied dieser Funktion festzustellen war.

Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf Zustände *in vivo* wird durch die oben geschilderte Temperaturdifferenz erschwert. Aber auch wenn sich die

Phagozytoseaktivitäten in vivo nicht unterscheiden sollte, können dennoch Differenzen in der Menge der aufgenommenen Bakterien sowie in der Effektivität der intrazellulären Keimabtötung bestehen. Eine klinische Auswirkung der genannten Aspekte ist denkbar. Dies wird durch eine Studie, welche eine veränderte intrazelluläre Tötungsaktivität bei HT-Patienten gemessen hatte (Szabo et al. 1996), unterstützt. Dieses intrazelluläre Funktionsdefizit der Granulozyten könnte die Induktion der HT durch bakterielle Infektionen erklären und einen therapeutischen Ansatzpunkt darstellen.

In dieser Studie wurden viele Einflussfaktoren nicht berücksichtigt. Andere AIK, Infektionen, Medikamenteneinnahmen etc. wurden nicht eruiert. Damit bleiben viele Möglichkeiten der Beeinflussung von Zellfunktionen ohne Beachtung. Nichtsdestotrotz haben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit orientierenden Charakter und rechtfertigen weitere Untersuchungen im Bereich der Funktion des CD45 im Zusammenhang mit AIK, um einen näheren Einblick in die Pathogenese von AIK zu erhalten. Dies kann den Grundstein für die Entwicklung neuer Möglichkeiten der Diagnostik und Therapie bilden.

9 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit postulieren, dass die C77G-Transversion nicht mit dem Auftreten der HT assoziiert ist, da diese genomische Veränderung sowohl im Patienten- als auch im Vergleichskollektiv mit einer Frequenz von 0,69% auftrat. Eine diagnostische Intervention über den genannten Polymorphismus ist deshalb nicht möglich. Eher geeignet scheint das veränderte CD45R-Expressionsmuster (in Bezug auf CD45RO, -RA und -RC auf T-Zellen sowie die CD45RB-Expression auf Granulozyten), wenn sich diese phänotypischen Veränderungen in weiteren Untersuchungen bestätigen.

Die Ergebnisse bzgl. der Phagozytoseaktivität haben zwar eine fragliche Auswirkung in vivo andere Einflussfaktoren, wie die Menge der aufgenommenen Bakterien und ihre intrazelluläre Abtötung, wurden nicht untersucht und können sich zwischen Patienten- und Kontrollgruppe durchaus unterscheiden.

Die CD45-Isoformen spielen vermutlich bei der Regulation der Phagozytose eine Rolle, weshalb die Aufklärung der, durch die CD45-Isoformen modulierten Funktionswege u.a. diagnostische Angriffspunkte liefern könnte. Auch therapeutische Aspekte sind denkbar. Sie könnten sich über die Modulation mit entsprechenden CD45R-AK vollziehen und damit die Elimination von pathologischen Keimen verbessern. Dies könnte den damit verbundenen Krankheitsausbruch einer AIK verzögern oder gar vermeiden.

10 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Auernhammer C. 2003. Hashimoto-Thyreoiditis. Aufl. Urban & Fischer.
- Badenhoop K, Schwarz G, Schleusener H, Weetman AP, Recks S, Peters H, Bottazzo GF, Usadel KH. 1992. Tumor necrosis factor beta gene polymorphisms in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 74 (2):287-291.
- Bagchi N, Brown TR, Herdegen DM, Dhar A, Sundick RS. 1990. Antioxidants delay the onset of thyroiditis in obese strain chickens. *Endocrinology*, 127 (4):1590-1595.
- Ballerini C, Rosati E, Salvetti M, Ristori G, Cannoni S, Biagioli T, Massacesi L, Sorbi S, Vergelli M. 2002. Protein tyrosine phosphatase receptor-type C exon 4 gene mutation distribution in an Italian multiple sclerosis population. *Neurosci Lett*, 328 (3):325-327.
- Barcellos LF, Caillier S, Dragone L, Elder M, Vittinghoff E, Bucher P, Lincoln RR, Pericak-Vance M, Haines JL, Weiss A, Hauser SL, Oksenberg JR. 2001. PTPRC (CD45) is not associated with the development of multiple sclerosis in U.S. patients. *Nat Genet*, 29 (1):23-24.
- Berger SA, Mak TW, Paige CJ. 1994. Leukocyte common antigen (CD45) is required for immunoglobulin E-mediated degranulation of mast cells. *J Exp Med*, 180 (2):471-476.
- Bilwes AM, den Hertog J, Hunter T, Noel JP. 1996. Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization. *Nature*, 382 (6591):555-559.
- Boxall S, McCormick J, Beverley P, Strobel S, De Filippi P, Dawes R, Klersy C, Clementi R, De Juli E, Ferster A, Wallace D, Arico M, Danesino C, Tchilian E. 2004a. Abnormal cell surface antigen expression in individuals with variant CD45 splicing and histiocytosis. *Pediatr Res*, 55 (3):478-484.
- Boxall S, Stanton T, Hirai K, Ward V, Yasui T, Tahara H, Tamori A, Nishiguchi S, Shiomi S, Ishiko O, Inaba M, Nishizawa Y, Dawes R, Bodmer W, Beverley PC, Tchilian EZ. 2004b. Disease associations and altered immune function in CD45 138G variant carriers. *Hum Mol Genet*, 13 (20):2377-2384.
- Boyages S, Bloot A, Maberly G, Eastman C, Li M, Qian Q, Liu D, van der Gaag R, Drexhage H. 1989. Thyroid autoimmunity in endemic goitre caused by excessive iodine intake. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 31 (4):453-465.
- Brix TH, Kyvik KO, Hegedus L. 1998a. What is the evidence of genetic factors in the etiology of Graves' disease? A brief review. *Thyroid*, 8 (8):727-734.
- Brix TH, Christensen K, Holm NV, Harvald B, Hegedus L. 1998b. A population-based study of Graves' disease in Danish twins. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 48 (4):397-400.

- Cahir McFarland E, Thomas M. 1995. CD45 protein-tyrosine phosphatase associated with the WW domain-containing protein, CD45AP, through the transmembrane region. *J Biol Chem*, 270:28103-28107.
- Caldwell CW, Patterson WP, Yesus YW. 1991a. Translocation of CD45RA in neutrophils. *J Leukoc Biol*, 49 (4):317-328.
- Caldwell CW, Patterson WP, Toalson BD, Yesus YW. 1991b. Surface and cytoplasmic expression of CD45 antigen isoforms in normal and malignant myeloid cell differentiation. *Am J Clin Pathol*, 95 (2):180-187.
- Caturegli P, Kimura H, Rocchi R, Rose NR. 2007. Autoimmune thyroid diseases. *Curr Opin Rheumatol*, 19 (1):44-48.
- Clement LT. 1992. Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: markers for human T-cell differentiation. *J Clin Immunol*, 12 (1):1-10.
- Cocco E, Murru MR, Melis C, Schirru L, Solla E, Lai M, Rolesu M, Marrosu MG. 2004. PTPRC (CD45) C77G mutation does not contribute to multiple sclerosis susceptibility in Sardinian patients. *J Neurol*, 251 (9):1085-1088.
- Cohen SB, Dijkstra CD, Weetman AP. 1988. Sequential analysis of experimental autoimmune thyroiditis induced by neonatal thymectomy in the Buffalo strain rat. *Cell Immunol*, 114 (1):126-136.
- Dawes R, Petrova S, Liu Z, Wraith D, Beverley PC, Tchilian EZ. 2006a. Combinations of CD45 isoforms are crucial for immune function and disease. *J Immunol*, 176 (6):3417-3425.
- Dawes R, Hennig B, Irving W, Petrova S, Boxall S, Ward V, Wallace D, Macallan DC, Thursz M, Hill A, Bodmer W, Beverley PC, Tchilian EZ. 2006b. Altered CD45 expression in C77G carriers influences immune function and outcome of hepatitis C infection. *J Med Genet*, 43 (8):678-684.
- Dayan CM, Daniels GH. 1996. Chronic autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med*, 335 (2):99-107.
- Desai DM, Sap J, Silvennoinen O, Schlessinger J, Weiss A. 1994. The catalytic activity of the CD45 membrane-proximal phosphatase domain is required for TCR signaling and regulation. *Embo J*, 13 (17):4002-4010.
- Do HT, Baars W, Schwinzer R. 2005. Functional significance of the 77C --> G polymorphism in the human CD45 gene: enhanced T-cell reactivity by variantly expressed CD45RA isoforms. *Transplant Proc*, 37 (1):51-52.
- Do HT, Baars W, Borns K, Windhagen A, Schwinzer R. 2006. The 77C->G mutation in the human CD45 (PTPRC) gene leads to increased intensity of TCR signaling in T cell lines from healthy individuals and patients with multiple sclerosis. *J Immunol*, 176 (2):931-938.
- Esteghamat F, Noorinayer B, Sanati MH, Hekmatdoost A, Zafarghandi M, Shalmani HM, Agah M, Zali MR. 2005. C77G mutation in protein tyrosine phosphatase CD45 gene and autoimmune hepatitis. *Hepatol Res*, 32 (3):154-157.

- Felberg J, Johnson P. 1998. Characterization of recombinant CD45 cytoplasmic domain proteins. Evidence for intramolecular and intermolecular interactions. *J Biol Chem*, 273 (28):17839-17845.
- Felberg J, Johnson P. 2000. Stable interdomain interaction within the cytoplasmic domain of CD45 increases enzyme stability. *Biochem Biophys Res Commun*, 271 (2):292-298.
- Fialkow L, Chan CK, Downey GP. 1997. Inhibition of CD45 during neutrophil activation. *J Immunol*, 158 (11):5409-5417.
- Gao H, Henderson A, Flynn DC, Landreth KS, Ericson SG. 2000. Effects of the protein tyrosine phosphatase CD45 on FcγRIIIa signaling and neutrophil function. *Exp Hematol*, 28 (9):1062-1070.
- Gatewood B, Joe J, Zigmond SH. 1991. CD45 is not involved in the processing of spatial information required for chemotaxis. *J Immunol*, 147 (1):243-246.
- GenoVision. 2004. The new GenoM-6 Wien: Quiagen.
- Gil J, Ruiz-Tiscar JL, Rodriguez-Sainz C, Hernandez A, Santamaria B, Garcia-Sanchez F, Fernandez-Cruz E. 2005. [Prevalence of C77G polymorphism in exon 4 of the CD45 gene in the Spanish population]. *Med Clin (Barc)*, 125 (1):10-11.
- Gomez-Lira M, Liguori M, Magnani C, Bonamini D, Salviati A, Leone M, Andreoli V, Trojano M, Valentino P, Savettieri G, Quattrone A, Pignatti PF, Momigliano-Richiardi P, Giordano M. 2003. CD45 and multiple sclerosis: the exon 4 C77G polymorphism (additional studies and meta-analysis) and new markers. *J Neuroimmunol*, 140 (1-2):216-221.
- Hall LR, Streuli M, Schlossman SF, Saito H. 1988. Complete exon-intron organization of the human leukocyte common antigen (CD45) gene. *J Immunol*, 141 (8):2781-2787.
- Hall SR, Heffernan BM, Thompson NT, Rowan WC. 1999. CD4⁺ CD45RA⁺ and CD4⁺ CD45RO⁺ T cells differ in their TCR-associated signaling responses. *Eur J Immunol*, 29 (7):2098-2106.
- Hamilton F, Black M, Farquharson MA, Stewart C, Foulis AK. 1991. Spatial correlation between thyroid epithelial cells expressing class II MHC molecules and interferon-gamma-containing lymphocytes in human thyroid autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*, 83 (1):64-68.
- Harvath L, Balke JA, Christiansen NP, Russell AA, Skubitz KM. 1991. Selected antibodies to leukocyte common antigen (CD45) inhibit human neutrophil chemotaxis. *J Immunol*, 146 (3):949-957.
- Hayami-Noumi K, Tsuchiya T, Moriyama Y, Noumi T. 2000. Intra- and intermolecular interactions of the catalytic domains of human CD45 protein tyrosine phosphatase. *FEBS Lett*, 468 (1):68-72.
- Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. 2003. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol*, 21:107-137.

- Herold C, Elhabazi A, Bismuth G, Bensussan A, Boumsell L. 1996. CD100 is associated with CD45 at the surface of human T lymphocytes. Role in T cell homotypic adhesion. *J Immunol*, 157:5262-5268.
- Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, Braverman LE. 2002. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab*, 87 (2):489-499.
- Hook WA, Berenstein EH, Zinsser FU, Fischler C, Siraganian RP. 1991. Monoclonal antibodies to the leukocyte common antigen (CD45) inhibit IgE-mediated histamine release from human basophils. *J Immunol*, 147 (8):2670-2676.
- Horie S, Kita H. 1994. CD11b/CD18 (Mac-1) is required for degranulation of human eosinophils induced by human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and platelet-activating factor. *J Immunol*, 152 (11):5457-5467.
- Horn A, Vosberg H, Wagner H. 1999. Schilddrüse konkret. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Hunt PJ, Marshall SE, Weetman AP, Bunce M, Bell JI, Wass JA, Welsh KI. 2001. Histocompatibility leucocyte antigens and closely linked immunomodulatory genes in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 55 (4):491-499.
- Ito C, Watanabe M, Okuda N, Watanabe C, Iwatani Y. 2006. Association between the severity of Hashimoto's disease and the functional +874A/T polymorphism in the interferon-gamma gene. *Endocr J*, 53 (4):473-478.
- Jacobsen M, Schweer D, Ziegler A, Gaber R, Schock S, Schwinzer R, Wonigeit K, Lindert RB, Kantarci O, Schaefer-Klein J, Schipper HI, Oertel WH, Heidenreich F, Weinshenker BG, Sommer N, Hemmer B. 2000. A point mutation in PTPRC is associated with the development of multiple sclerosis. *Nat Genet*, 26 (4):495-499.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2002. Immunologie. 5te Aufl. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer.
- Jensen GS, Poppema S, Mant MJ, Pilarski LM. 1989. Transition in CD45 isoform expression during differentiation of normal and abnormal B cells. *Int Immunol*, 1 (3):229-236.
- Karanikas G, Schuetz M, Wahl K, Paul M, Kontur S, Pietschmann P, Kletter K, Dudczak R, Willheim M. 2005. Relation of anti-TPO autoantibody titre and T-lymphocyte cytokine production patterns in Hashimoto's thyroiditis. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 63 (2):191-196.
- Kitamura K, Maiti A, Ng D, Johnson P, Maizel A, Takeda A. 1995. Characterization of the interaction between CD45 and CD45-AP. *J Biol Chem*, 270:21151-21157.

- Knol EF, Tackey F, Tedder TF, Klunk DA, Bickel CA, Sterbinsky SA, Bochner BS. 1994. Comparison of human eosinophil and neutrophil adhesion to endothelial cells under nonstatic conditions. Role of L-selectin. *J Immunol*, 153 (5):2161-2167.
- Kuijpers TW, Hoogerwerf M, Roos D. 1992. Neutrophil migration across monolayers of resting or cytokine-activated endothelial cells. Role of intracellular calcium changes and fusion of specific granules with the plasma membrane. *J Immunol*, 148 (1):72-77.
- Kung C, Pingel JT, Heikinheimo M, Klemola T, Varkila K, Yoo LI, Vuopala K, Poyhonen M, Uhari M, Rogers M, Speck SH, Chatila T, Thomas ML. 2000. Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease. *Nat Med*, 6 (3):343-345.
- Liles WC, Ledbetter JA, Waltersdorph AW, Klebanoff SJ. 1995. Cross-linking of CD45 enhances activation of the respiratory burst in response to specific stimuli in human phagocytes. *J Immunol*, 155 (4):2175-2184.
- Lokeshwar V, Bourguignon L. 1992. Tyrosine phosphatase activity of lymphoma CD45 (GP180) is regulated by a direct interaction with the cytoskeleton. *J Biol Chem*, 267 (21):551-557.
- Lynch KW, Weiss A. 2001. A CD45 polymorphism associated with multiple sclerosis disrupts an exonic splicing silencer. *J Biol Chem*, 276 (26):24341-24347.
- Manji N, Carr-Smith JD, Boelaert K, Allahabadia A, Armitage M, Chatterjee VK, Lazarus JH, Pearce SH, Vaidya B, Gough SC, Franklyn JA. 2006. Influences of age, gender, smoking, and family history on autoimmune thyroid disease phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*, 91 (12):4873-4880.
- Matsumoto K, Bochner BS, Wakiguchi H, Kurashige T. 1998. Altered expression of CD11b and CD62L after cross-linking of CD45 isoforms on human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol*, 117 Suppl 1:34-39.
- McKenzie JM, Zakarija M. 1996. *Antibodies in Autoimmune Thyroid Disease*. 7te Aufl. Philadelphia, New York: Lippincott-Raven Publisher.
- Meng W. 2001. *Schilddrüsenerkrankungen*. Aufl. Urban & Fischer.
- Mitchell GB, Khandaker MH, Rahimpour R, Xu L, Lazarovits AI, Pickering JG, Suria H, Madrenas J, Pomerantz DK, Feldman RD, Kelvin DJ. 1999. CD45 modulation of CXCR1 and CXCR2 in human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Immunol*, 29 (5):1467-1476.
- Miterski B, Sindern E, Haupts M, Schimrigk S, Epplen JT. 2002. PTPRC (CD45) is not associated with multiple sclerosis in a large cohort of German patients. *BMC Med Genet*, 3:3.
- Miterski B, Drynda S, Boschow G, Klein W, Oppermann J, Kekow J, Epplen JT. 2004. Complex genetic predisposition in adult and juvenile rheumatoid arthritis. *BMC Genet*, 5:2.
- Miyachi H, Tanaka Y, Gondo K, Kawada T, Kato S, Sasao T, Hotta T, Oshima S, Ando Y. 1999. Altered expression of CD45 isoforms in differentiation of acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*, 62 (3):159-164.

- Nawroth PP, Ziegler R. 2001. klinische Endokrinologie und Stoffwechsel. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Neeley SP, Hamann KJ, White SR, Baranowski SL, Burch RA, Leff AR. 1993. Selective regulation of expression of surface adhesion molecules Mac-1, L-selectin, and VLA-4 on human eosinophils and neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 8 (6):633-639.
- Ng HP, Banga JP, Kung AW. 2004. Development of a murine model of autoimmune thyroiditis induced with homologous mouse thyroid peroxidase. *Endocrinology*, 145 (2):809-816.
- Nicholas RS, Partridge J, Donn RP, Hawkins C, Boggild MD. 2003. The role of the PTPRC (CD45) mutation in the development of multiple sclerosis in the North West region of the United Kingdom. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 74 (7):944-945.
- Olerup. 2003. Material Safety Data Sheet
- Olerup SSPTM SSP kits Saltsjöbaden: Olerup SSP.
- Orpegen. 7/96. Testkit zur quantitativen Bestimmung der Phagozytoseaktivität von Monozyten und Granulozyten in heparinisiertem Vollblut Heidelberg: Orpegen Pharma.
- Pace K, Lee C, Stewart P, Baum L. 1999. Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced galectin-1. *J Immunol*, 163:3801-3811.
- Pace K, Hahn H, Pang M, Nguyen J, Baum L. 2000. Cutting edge: CD7 delivers a pro-apoptotic signal during galectin-1 induced T cell death. *J Immunol*, 165:2331-2334.
- Parle JV, Franklyn JA, Cross KW, Jones SC, Sheppard MC. 1991. Prevalence and follow-up of abnormal thyrotrophin (TSH) concentrations in the elderly in the United Kingdom. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 34 (1):77-83.
- Patterson WP, Caldwell CW, Yesus YW. 1993. In vivo upregulation of CD45RA in neutrophils of acutely infected patients. *Clin Immunol Immunopathol*, 68 (1):35-40.
- Petricoin E, Ito S, Williams B, Audet S, Stancato L. 1997. Antiproliferative action of interferon-alpha requires components of t-cell-receptor signalling. *Nature*, 390:629-632.
- Portiankina L, Gasanova T, Shanina L, Konopleva T. 1991. The role of viral and bacterial infections in the development of chronic autoimmune thyroiditis. *Pediatrics*, 2:41-44.
- Quaratino S, Badami E, Pang YY, Bartok I, Dyson J, Kioussis D, Londei M, Maiuri L. 2004. Degenerate self-reactive human T-cell receptor causes spontaneous autoimmune disease in mice. *Nat Med*, 10 (9):920-926.
- Rapoport B. 1991. Pathophysiology of Hashimoto's thyroiditis and hypothyroidism. *Annu Rev Med*, 42:91-96.

- Rebstock K. 2006. Frequenzanalyse einer Punktmutation im Exon A des CD45 Gens und lymphozytäre CD45RC Expressionsmuster bei Patienten mit Morbus Chron und Colitis ulcerosa im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv Jena: Friedrich-Schiller Universität.
- Riede U-N, Werner M, Schäfer H-E. 2004. Allgemeine und spezielle Pathologie. 5te Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Rogers PR, Pilapil S, Hayakawa K, Romain PL, Parker DC. 1992. CD45 alternative exon expression in murine and human CD4+ T cell subsets. *J Immunol*, 148 (12):4054-4065.
- Rothrock C, Cannon B, Hahm B, Lynch KW. 2003. A conserved signal-responsive sequence mediates activation-induced alternative splicing of CD45. *Mol Cell*, 12 (5):1317-1324.
- Sabouri AH, Saito M, Matsumoto W, Kodama D, Farid R, Izumo S, Usuku K, Osame M. 2003. A C77G point mutation in CD45 exon 4, which is associated with the development of multiple sclerosis and increased susceptibility to HIV-1 infection, is undetectable in Japanese population. *Eur J Neurol*, 10 (6):737-739.
- Sawin CT. 2002. The heritage of Dr. Hakaru Hashimoto (1881-1934). *Endocr J*, 49 (4):399-403.
- Schott M, Scherbaum WA. 2006. Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen. *Deutsches Ärzteblatt*, 103 (45):3023-3032.
- Schwinzer R, Wonigeit K. 1990. Genetically determined lack of CD45R- T cells in healthy individuals. Evidence for a regulatory polymorphism of CD45R antigen expression. *J Exp Med*, 171 (5):1803-1808.
- Schwinzer R, Schraven B, Kyas U, Meuer SC, Wonigeit K. 1992. Phenotypical and biochemical characterization of a variant CD45R expression pattern in human leukocytes. *Eur J Immunol*, 22 (4):1095-1098.
- Schwinzer R, Witte T, Hundrieser J, Ehlers S, Momot T, Hunzelmann N, Krieg T, Schmidt RE, Wonigeit K. 2003. Enhanced frequency of a PTPRC (CD45) exon A mutation (77C-->G) in systemic sclerosis. *Genes Immun*, 4 (2):168-169.
- Scott CS, Richards SJ, Cole JC, Gooi HC. 1991. Variant CD45R expression with autosomal dominant inheritance affects both helper/inducer (CD4+) and suppressor/cytotoxic (CD8+) T cell populations. *Clin Exp Immunol*, 86 (3):500-505.
- Spelsberg F, Negele T, Ritter MM. 2000. Die Schilddrüse in Klinik und Praxis. Aufl. Heidelberg: Johann Ambrosius Barth Verlag.
- Stamenkovic I, SgROI D, Aruffo A, Sy MS, Anderson T. 1991. The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and alpha2-6 sialyltransferase, CD75, on B cells. *Cell*, 66 (6):1133-1144.

- Stanton T, Boxall S, Hirai K, Dawes R, Tonks S, Yasui T, Kanaoka Y, Yuldasheva N, Ishiko O, Bodmer W, Beverley PC, Tchilian EZ. 2003. A high-frequency polymorphism in exon 6 of the CD45 tyrosine phosphatase gene (PTPRC) resulting in altered isoform expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (10):5997-6002.
- Stibenz D, Buhner C, Laufer D, Obladen M. 1996. CD45 engagement induces L-selectin down-regulation. *Scand J Immunol*, 44 (1):37-44.
- Subra J-F, Cautain B, Xystrakis E, Mas M, Lagrange D, van der Heijden H, van de Gaar M-J, Druet P, Fournié GJ, Saoudi A, Damoiseaux J. 2001. The balance between CD45RChigh and CD45RClow CD4 T cells in rats is intrinsic to bone marrow-derived cells and is genetically controlled. *J Immunol*, 166:2944-2952.
- Sundick RS. 1990. Iodine in autoimmune thyroiditis. *Immunol Ser*, 52:213-228.
- Szabo J, Foris G, Mezosi E, Nagy EV, Paragh G, Sztojka I, Leovey A. 1996. Parameters of respiratory burst and arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear granulocytes from patients with various thyroid diseases. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 104 (2):172-176.
- Sztankay A, Trieb K, Lucciarini P, Steiner E, Grubeck-Loebenstien B. 1994. Interferon gamma and iodide increase the inducibility of the 72 kD heat shock protein in cultured human thyroid epithelial cells. *J Autoimmun*, 7 (2):219-230.
- Tackenberg B, Nitschke M, Willcox N, Ziegler A, Nessler S, Schumm F, Oertel WH, Hemmer B, Sommer N. 2003. CD45 isoform expression in autoimmune myasthenia gravis. *Autoimmunity*, 36 (2):117-121.
- Tandon N, Yan SL, Morgan BP, Weetman AP. 1994. Expression and function of multiple regulators of complement activation in autoimmune thyroid disease. *Immunology*, 81 (4):643-647.
- Tchilian EZ, Beverley PC. 2006. Altered CD45 expression and disease. *Trends Immunol*, 27 (3):146-153.
- Tchilian EZ, Wallace DL, Wells RS, Flower DR, Morgan G, Beverley PC. 2001a. A deletion in the gene encoding the CD45 antigen in a patient with SCID. *J Immunol*, 166 (2):1308-1313.
- Tchilian EZ, Wallace DL, Dawes R, Imami N, Burton C, Gotch F, Beverley PC. 2001b. A point mutation in CD45 may be associated with an increased risk of HIV-1 infection. *Aids*, 15 (14):1892-1894.
- Tchilian EZ, Dawes R, Ramaley PA, Whitworth JA, Yuldasheva N, Wells RS, Watera C, French N, Gilks CF, Kunachiwa W, Ruzibakiev R, Leetrakool N, Carrington CV, Ramdath DD, Gotch F, Stephens HA, Hill AV, Beverley PC. 2002. A CD45 polymorphism associated with abnormal splicing is absent in African populations. *Immunogenetics*, 53 (10-11):980-983.

- Ten Hove T, The Olle F, Berkhout M, Bruggeman JP, Vyth-Dreese FA, Slors JF, Van Deventer SJ, Te Velde AA. 2004. Expression of CD45RB functionally distinguishes intestinal T lymphocytes in inflammatory bowel disease. *J Leukoc Biol*, 75 (6):1010-1015.
- Thomas ML. 1989. The leukocyte common antigen family. *Annu Rev Immunol*, 7:339-369.
- Thude H, Hundrieser J, Wonigeit K, Schwinzer R. 1995. A point mutation in the human CD45 gene associated with defective splicing of exon A. *Eur J Immunol*, 25 (7):2101-2106.
- Thude H, Rosenhahn S, Hunger-Dathe W, Muller UA, Barz D. 2004. A transmembrane protein-tyrosine phosphatase receptor type C (CD45) exon A point mutation (77 C to G) is not associated with the development of type 1 diabetes mellitus in a German population. *Eur J Immunogenet*, 31 (6):245-247.
- Thude H, Gerlach K, Richartz B, Krack A, Brenke B, Pethig K, Figulla HR, Barz D. 2005. No association between transmembrane protein-tyrosine phosphatase receptor type C (CD45) exon A point mutation (77C>G) and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Hum Immunol*, 66 (9):1008-1012.
- Tomer Y, Davies TF. 1993. Infection, thyroid disease, and autoimmunity. *Endocr Rev*, 14 (1):107-120.
- Trowbridge IS, Thomas ML. 1994. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol*, 12:85-116.
- Tsai AY, Streuli M, Saito H. 1989. Integrity of the exon 6 sequence is essential for tissue-specific alternative splicing of human leukocyte common antigen pre-mRNA. *Mol Cell Biol*, 9 (10):4550-4555.
- Valeix P, Dos Santos C, Castetbon K, Bertrais S, Cousty C, Hercberg S. 2004. [Thyroid hormone levels and thyroid dysfunction of French adults participating in the SU.VI.MAX study.]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 65 (6):477-486.
- Vogel A, Strassburg CP, Manns MP. 2003. 77 C/G mutation in the tyrosine phosphatase CD45 gene and autoimmune hepatitis: evidence for a genetic link. *Genes Immun*, 4 (1):79-81.
- Volpé R. 1994. Autoimmune Endocrinopathies: Aspects of Pathogenesis and the Role of Immune Assays in Investigation and Management. *Clin Chem*, 40 (11):2132-2145.
- Voorby HA, Van der Gaag RD, Jeucken PH, Bloot AM, Drexhage HA. 1989. The goitre of the BB/O rat: an animal-model for studying the role of immunoglobulins stimulating growth of thyroid cells. *Clin Exp Immunol*, 76 (2):290-295.
- Vorechovsky I, Kralovicova J, Tchilian E, Masterman T, Zhang Z, Ferry B, Misbah S, Chapel H, Webster D, Hellgren D, Anvret M, Hillert J, Hammarstrom L, Beverley PC. 2001. Does 77C-->G in PTPRC modify autoimmune disorders linked to the major histocompatibility locus? *Nat Genet*, 29 (1):22-23.

- Vyshkina T, Leist TP, Shugart YY, Kalman B. 2004. CD45 (PTPRC) as a candidate gene in multiple sclerosis. *Mult Scler*, 10 (6):614-617.
- Walzel H, Schulz U, Neels P, Brock J. 1999. Galectin-1, a natural ligand for the receptor-type protein tyrosine phosphatase CD45. *Immunology Letters*, 67 (3):193-202.
- Weetman AP, Tandon N, Morgan BP. 1992. Antithyroid drugs and release of inflammatory mediators by complement-attacked thyroid cells. *Lancet*, 340 (8820):633-636.
- Weetman AP, Cohen SB, Oleesky DA, Morgan BP. 1989. Terminal complement complexes and C1/C1 inhibitor complexes in autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol*, 77 (1):25-30.
- Weetman AP, Volkman DJ, Burman KD, Gerrard TL, Fauci AS. 1985. The in vitro regulation of human thyrocyte HLA-DR antigen expression. *J Clin Endocrinol Metab*, 61 (5):817-824.
- Wood JP, Bieda K, Segni M, Herwig J, Krause M, Usadel KH, Badenhop K. 2002. CD45 exon 4 point mutation does not confer susceptibility to type 1 diabetes mellitus or Graves' disease. *Eur J Immunogenet*, 29 (1):73-74.
- Wu L, Fu J, Shen S. 2002. SKAP55 coupled with CD45 positively regulates T-cell receptor-mediated gene transcription. *Mol Cell Biol*, 22:2673-2686.
- Wu Z, Podack ER, McKenzie JM, Olsen KJ, Zakarija M. 1994. Perforin expression by thyroid-infiltrating T cells in autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol*, 98 (3):470-477.
- Xu Z, Weiss A. 2002. Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms. *Nat Immunol*, 3 (8):764-771.
- Xystrakis E, Cavailles P, Dejean A-S, Cautain B, Colacios C, Lagrange D, van de Gaar M-J, Bernard I, Gonzalez-Dunia D, Damoiseaux J, Fournié GJ, Saoudi A. 2004. Functional and genetic analysis of two CD8 T cell subsets defined by the level of CD45RC expression in the rat. *J Immunol*, 173:3140-3147.
- Yu C, Yu HS, Sun KH, Hsieh SC, Tsai CY. 2002. Anti-CD45 isoform antibodies enhance phagocytosis and gene expression of IL-8 and TNF-alpha in human neutrophils by differential suppression on protein tyrosine phosphorylation and p56lck tyrosine kinase. *Clin Exp Immunol*, 129 (1):78-85.
- Zapata JM, Pulido R, Acevedo A, Sanchez-Madrid F, de Landazuri MO. 1994. Human CD45RC specificity. A novel marker for T cells at different maturation and activation stages. *J Immunol*, 152 (8):3852-3861.
- Zilch CF, Walker AM, Timon M, Goff LK, Wallace DL, Beverley PC. 1998. A point mutation within CD45 exon A is the cause of variant CD45RA splicing in humans. *Eur J Immunol*, 28 (1):22-29.

11 Anhang

Aufklärungsbogen



Universitätsklinikum Jena

Universitätsklinikum Jena - Pordirch - 07740 Jena

Medizinische Fakultät

Institut
für Transfusionsmedizin

Besuchsalresse: Stoystraße 3
D-07743 Jena

Direktorin: Univ.-Prof.
Dr. med. habil. Dagmar Barz
Dr. rer. nat. H. Thude

Telefon: 036 41 - 93 54 00
Telefax: 036 41 - 93 54 62
Mobil-Tel.: 0170 9661063

E-Mail:
ssekretariat.ITM@med.uni-jena.de
dagmar.barz@med.uni-jena.de

Jena, den 26.01.05

Patientenaufklärung

Titel der Studie: Ist eine definierte Punktmutation im CD45 Gen mit der Erkrankung chronische Autoimmunthyreoiditis assoziiert?

Chronische Autoimmunthyreoiditis auch genannt Hashimoto-Thyreoiditis ist eine langsam fortschreitende Schilddrüsenentzündung, die durch ein fehlgeleitetes Immunsystem mit irrtümlicher Reaktivität gegen körpereigene Strukturen (Autoimmunerkrankung) verursacht wird. Sie ist gekennzeichnet durch das Auftreten von Autoantikörpern gegen Schilddrüsenproteine (thyreoidale Peroxidase und Thyreoglobulin) und durch den Nachweis von T-Lymphozyten (weiße Blutzellen) mit Reaktivität gegen das Schilddrüsenengewebe (1,2). Aus der Zerstörung des Schilddrüsenengewebes resultiert letztendlich eine Schilddrüsenunterfunktion (Hypothyreose). Zahlreiche Veränderungen (Mutationen) im Erbgut (besteht aus Genen) und Umwelteinflüsse sind für die Ausprägung einer Autoimmunthyreoiditis verantwortlich. Es ist nachgewiesen, daß Veränderungen im Gen für CTLA-4 Protein und Allele (Zustandform eines Genes) des HLA-DRB1* Genortes mit der Erkrankung Autoimmunthyreoiditis assoziiert sind (1). In welchem Umfang weitere Gene betroffen sind, ist unklar. Deshalb soll mit Hilfe der Studie analysiert werden, ob eine bestimmte Veränderung (C zu G Austausch an Position 77 von Exon A des CD45 Gens) im Gen für das CD45 Protein mit der Erkrankung Autoimmunthyreoiditis assoziiert ist. Andere Studien haben zeigen können, daß diese Veränderung im CD45 Gen mit den Autoimmunerkrankungen Multiple Sklerose (3), Autoimmunhepatitis (4) und Sklerodermie (5) assoziiert ist. Diese Veränderung verursacht auf den Zellen des Immunsystems (wie z.B. auf den weißen Blutzellen) ein untypisches Muster für das CD45 Protein (6). Denkbar ist, daß durch das andersartige CD45 Proteinmuster die funktionellen Eigenschaften der Zellen des Immunsystems verändert werden, wodurch autoimmunologische Prozesse begünstigt werden. Deshalb trägt die Studie auch dazu bei, die Entstehungsmechanismen für Autoimmunerkrankungen und insbesondere für die Autoimmunthyreoiditis besser zu verstehen.

Literatur

1. Fountoulakis, S., Tsatsoulis, A. (2004). On the pathogenesis of autoimmune thyroid disease: a unifying hypothesis. *Clinical Endocrinology* 60: 397-409
2. Blüher, M., Krohn, K., Wallaschofski, H., Bravermann, L., Paschke, R. (1999). Cytokine gene expression in autoimmune thyroiditis in Bio-Breeding/Worcester rats. *Thyroid* 9: 1049-1055
3. Jacobsen, M., Schweer, D., Ziegler, A., Gaber, R., Schock, S., Schwinzer, R., Wonigeit, K., Lindert, R., Kantarci, O., Schaefer-Klein, J., Schipper, H., Oertel, W., Heidenreich, F., Weinhenker, B., Sommer, N., Hemmer, B. (2000). A point mutation in PTPRC is associated with the development of multiple sclerosis. *Nat Genet* 26: 495-499
4. Vogel, A., Straasburg, C., Mann, M. (2003). 77 C/G mutation in the tyrosine phosphatase CD45 gene and autoimmune hepatitis: evidence for a genetic link. *Genes Immun* 4: 79-81
5. Schwinzer, R., Witte, T., Hundrieser, J., Ehlers, S., Momot, T., Hunzelmann, N., Krieg, T., Schmidt, R., Wonigeit, K. (2003). Enhanced frequency of a PTPRC (CD45) exon A A mutation (77 C to G) in systemic sclerosis. *Genes Immun* 4: 168-169
6. Thude, H., Hundrieser, J., Wonigeit, K., Schwinzer, R. (1995). A point mutation in the human CD45 gene associated with defective splicing of exon A. *Eur J Immunol* 25: 2101-2106

Studienablauf

Im Rahmen der Routineblutentnahme werden dem Patienten/in 10ml Citratblut entnommen. Ein Teil der Blutprobe wird verwendet, um die verschiedenen Molekülformen des CD45 Proteins auf Lymphozyten nachzuweisen. Hierfür werden die Lymphozyten mit fluoreszenzmarkierten CD45RA und CD45RO Antikörpern (Detektoren) angefärbt und anschließend im Durchflußzytometer analysiert. Aus der Analyse ergibt sich ein Bild, das Rückschlüsse zuläßt, ob bei dem Patienten/in ein normales CD45 Molekülmuster oder ein variantes untypisches CD45 Molekülmuster vorliegt. Die Daten aus der phänotypischen (ausgeprägte CD45 Muster) Analyse müssen mit den genotypischen Daten (vorliegende Gen für CD45) korreliert werden. Deshalb wird aus dem zweiten Teil der Blutprobe die DNA (Moleküle für die Erbinformation) isoliert und ein relevanter Bereich des CD45 Gens mit der Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt und anschließend mit dem Restriktionsenzym (biologische Schere) zerschnitten. Aus dem Schnittmuster läßt sich ableiten, ob der Patient/in eine definierte Punktmutation (Erbveränderung an einer definierten Stelle) im CD45 Gen trägt, die das variante CD45 Molekülmuster verursacht. Abschließend kann für die Punktmutation die Häufigkeit des Auftretens im Patientenkollektiv bestimmt werden und mit der Häufigkeit in einem Kontrollkollektiv aus gesunden Blutspendern/innen statistisch verglichen werden. Dadurch kann ermittelt werden, ob die Punktmutation mit der Erkrankung chronische Autoimmunthyreoiditis assoziiert ist und somit möglicherweise eine Bedeutung für die Pathogenese dieser Erkrankung hat.

Risikoabwägung: Das Risiko der Studie ist als äußerst gering einzustufen, da nur max. 10ml Citratblut vom Patienten/in benötigt werden, die im Rahmen der Routineblutentnahme gewonnen werden.

Universitätsklinikum Jena

Probandenversicherung: Da das Blut im Rahmen der Routineuntersuchungen gewonnen wird, sind die Patienten durch die Haftpflichtversicherung des Klinikums versichert.

Datenauswertung: Alle Daten werden gesammelt und anonymisiert, damit ein direkter Rückschluß auf eine Person nicht möglich ist. Nur der Leiter der Studie ist in der Lage, einzelne Personen zu identifizieren. Autorisierte Mitarbeiter der gesetzlichen Überwachungsbehörden können zur Gewährleistung der ordnungsgemäßen Durchführung der Prüfung, der Datenerhebung und der Dateizuordnung zu bestimmten Patienten mit dem Prüfarzt einen stichprobenartigen Abgleich der Daten mit einer Interviewtechnik vornehmen. Hierbei dürfen lediglich die studienbezogenen erhobenen Daten erfragt werden. Ein direkter Einblick der externen Prüfer in die Krankenunterlagen ist in jedem Falle ausgeschlossen. Darüberhinaus unterliegen auch diese Prüfer der Schweigepflicht. Im Falle einer Veröffentlichung der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten unter Beachtung des Bundesdatenschutzgesetzes gewährleistet.

Freiwilligkeit und Rücktrittsklausel: Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Es besteht jederzeit das Recht ohne Angabe von Gründen von der Studie zurückzutreten. Durch die Nichtteilnahme an der Studie entstehen keine Nachteile.

Aufklärende Ärzte:

Prof. Dr. D. Barz (Institut für Transfusionsmedizin), Prof. Dr. UA. Müller (Klinik für Innere Medizin III), Dr. H. Thude (Institut für Transfusionsmedizin), Dr. C. Kloos (Klinik für Innere Medizin III), Dr. C. Lindloh (Klinik für Innere Medizin III)

Prof. Dr. med. Dagmar B.
 Institutsdirektorin
 Institut für Transfusionsmedizin
 Universitätsklinikum Jena
 07740 Jena / Tel.: 03641 / 935467



Prof. Dr. D. Barz

Prof. Dr. med. univ. UA. Müller MSc
 Klinik für Innere Medizin III
 Universitätsklinikum Jena
 07740 Jena / Tel.: 03641 / 935467

Prof. Dr. UA. Müller



Universitätsklinikum Jena

Universitätsklinikum Jena · Postfach - 07740 Jena

Medizinische Fakultät

Institut
für Transfusionsmedizin

Besuchsadresse: Stoystraße 3
D-07743 Jena

Direktorin: Univ.-Prof.
Dr. med. habil. Dagmar Barz

Telefon: 0 36 41 - 93 54 60
Telefax: 0 36 41 - 93 54 62
Mobil-Tel.: 0170 9860003

E-Mail:
sekretariat.ITM@med.uni-jena
dagmar.barz@med.uni-jena.de

Jena, den 26.01.05

Einwilligungserklärung

Hiermit erkläre ich mich bereit, an der Studie „Ist eine definierte Punktmutation im CD45 Gen mit der Erkrankung chronische Autoimmunthyreoiditis assoziiert?“ teilzunehmen. Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Alle erhobenen Daten unterliegen dem Datenschutz. Mir ist bekannt, daß ich die Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen kann.

Über Art, Zweck und Ablauf der Studie wurde ich durch den Arzt..... ausreichend aufgeklärt, alle Fragen wurden befriedigend geklärt und die schriftliche Patienteninformation habe ich erhalten.

.....
Ort/ Datum

.....
Unterschrift des Probanden/der Probandin

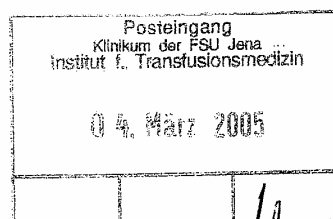
.....
Unterschrift des Arztes

Votum der Ethikkommission

ETHIK-KOMMISSION
DER FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA
 an der Medizinischen Fakultät

Frau
 Prof. Dr. D. Barz
 Institut für Transfusionsmedizin

07740 Jena



25.02.05

Bearbeitungs-Nr.: 1491-02/05

Sehr verehrte Frau Kollegin,

in ihrer Sitzung am 24.02.2005 hat die Ethik-Kommission der Friedrich-Schiller Universität Ihren Antrag:

Ist eine definierte Punktmutation im CD45 Gen mit der Erkrankung chronischer Autoimmunthyreoiditis assoziiert?

beraten und erhebt aus ethischer Sicht keine Bedenken.

Wir bitten Sie, die Probandeninformation zu überarbeiten, die aus unserer Sicht zu fachspezifisch ist. Die Literaturverweise sollten entfernt werden.

Wir wünschen Ihnen viel Erfolg!

Mit kollegialem Gruß

Prof. Dr. med. U. Brandl
 Stellv. Vorsitzender der Ethik-Kommission

Geschäftsstelle der Ethik-Kommission Bachstraße 18 07740 Jena Fon: 03641-933 770 Fax: 03641-933 771
 Leiterin der Geschäftsstelle: Dr. U. Skorsetz
 Mitglieder: Ärzte: Prof. Dr. D. Barz, Prof. Dr. U. Brandl, PD Dr. K. Farkner, Dr. A. Machnik, OA Dr. H. Sayer,
 Jurist: Prof. Dr. E. Eichenhofer, Medizintechniker: U. Kirsch; Ethiker: Prof. Dr. N. Knoepfler; Pflege: M. Gemat

Lebenslauf

Name: Weißenborn, Sina
Geburtstag: 09. Juni 1984
Geburtsort: Schmalkalden
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schul Ausbildung:

1990-1993 Grundschule Roßdorf
1993-1994 Grundschule Wiesenthal
1994-2002 Werratal-Gymnasium Schwallungen (Abitur)

Hochschulausbildung:

seit 10/02 Studium der Humanmedizin, Friedrich-Schiller Universität Jena
08/04 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum)
06/09 Erlangung der Approbation

Famulaturen:

03/05 Anästhesie & Notfallmedizin
Klinikum Meiningen, Deutschland
08/05 Notfallmedizin
US Army Hospital, Würzburg, Deutschland
08/06 Innere Medizin
Dumfries & Galloway Royal Infirmary, Dumfries, UK
09/06 Nephrologie
Mount Sinai Hospital, New York, USA
03/07 Innere Medizin, Pädiatrie, Gynäkologie & Geburtshilfe
Hospital Obispo Polanco, Teruel, Spanien

Tertiale des Praktischen Jahres:

- 1.) 08/07-11/07 Chirurgie
Kantonsspital Obwalden, Sarnen, Schweiz
- 2.) 12/07-03/08 Innere Medizin
Südharzkrankenhaus, Nordhausen, Deutschland
- 3.) 04/08-07/08 Anästhesie und Intensivmedizin
1. Teil: SRH Wald-Klinikum, Gera, Deutschland
2. Teil: Greenslopes Private Hospital, Brisbane, Australien

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Dagmar Barz, Direktorin des Instituts für Transfusionsmedizin der FSU Jena für die Überlassung des Themas sowie die stets freundliche Unterstützung und hilfreichen Anregungen bei der Erstellung der Arbeit.

Auch Herrn Dr. rer. nat. Hansjörg Thude, Leiter des HLA-Labors des Instituts für Transfusionsmedizin der FSU Jena, gebührt für die wertvolle Hilfestellung während der experimentellen Phase, sowie die durchweg intensive fachliche Beratung und kritische Beurteilung der Arbeit ein besonderes Dankeschön.

Den Mitarbeiter/-innen des HLA-Labors danke ich für die freundliche Hilfe und Unterstützung in praktischen Fragen sowie für die Durchführung von Teilaspekten der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Alfons Müller und seinen ärztlichen Kollegen der endokrinologischen Ambulanz der KIM II möchte ich meine Dankbarkeit für die gute Zusammenarbeit aussprechen. Sie haben die Auswahl und Aufklärung der Patienten übernommen und bildeten somit einen entscheidenden Beitrag zu dieser Arbeit. Außerdem gebührt Schwester Silvia Drewelow ein großes Lob. Sie hat in aufopferungsvoller Weise die termingerechte Materialentnahme organisiert.

Frau Dipl.-Math. Antje Brandstädt und Herrn Dr. rer. nat. Rüdiger Vollandt danke ich für die hilfreiche statistische Beratung.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kamradt möchte ich mich für die bereitwillige Auskunft und liebevolle Aufmunterung bedanken.

Für die intensive und lang anhaltende Motivation und die gute Freundschaft gebührt Franziska Lorenz meine besondere Anerkennung. Danke, dass du immer für mich da warst.

Herrn Uwe Schwender möchte ich für seine schnelle und zuverlässige Auskunft bzgl. akuter grammatikalischer Notfälle danken.

Nicht zuletzt wäre ohne die liebevolle Unterstützung und das Verständnis meiner Familie diese Arbeit nie zu Stande gekommen.

Danke.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Frau Prof. Dr. med. Dagmar Barz
- Herr Prof. Dr. med. Ulrich Alfons Müller
- Herr Dr. rer. nat. Hansjörg Thude
- Herr Dr. rer. nat. Rüdiger Vollandt
- Frau Dipl.-Math. Antje Brandstädt

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Sina Weißenborn